



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

Thèse de Doctorat
Spécialité : Biotechnologie – Microbiologie

**Validation d'un diagnostic de la peste
porcine africaine (PPA) utilisant des
papiers buvards et caractérisation
moléculaire de souches malgaches**

Présentée par

RANDRIAMPARANY Tantely

Titulaire de DEA de Biochimie
Option : Biotechnologie – Microbiologie

Soutenue publiquement le 12 février 2016
devant les membres de jury :

Président de jury
Rapporteur interne
Rapporteur externe
Examineurs

Directeurs de thèse

: Pr RAZANAMPARANY Julia Louisette
: Pr ANDRIANTSIMAHAVANDY Abel A.
: Pr RAKOTOZANDRINDRAINY Raphaël
: Pr RASAMBAINARIVO Jhon Henri
: Dr HDR RAMANANKIERANA Heriniaina
: Pr RAHERIMANDIMBY Marson
: Dr HDR ALBINA Emmanuel



**INTERNATIONAL
FOUNDATION FOR
SCIENCE**



AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR 15 CIRAD/INRA "Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes" (Montpellier-France) et du Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire (LNDV) (Antananarivo - Madagascar) sous la direction de :

- Monsieur Marson RAHERIMANDIMBY : Doyen de la Faculté des Sciences et Professeur titulaire au Département de Biochimie Appliquée (Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, Madagascar) ;
- Monsieur Emmanuel ALBINA : Directeur de Recherche (HDR) à l'UMR15 CIRAD-INRA (Montpellier-France),

Encadré par :

- Monsieur Vincent MICHAUD à l'UMR15 CIRAD/INRA (Montpellier-France)

Le travail a été soutenu financièrement par :

- SCAC-Ambassade de France
- Appui aux Doctorants (DESI)
- International Fondation for Science (Suède)

et matériellement par :

- UMR15 CIRAD-INRA
- Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire (LNDV)

auxquels nous exprimons ici notre profonde reconnaissance.

DEDICACE

Je dédie cette thèse à ma petite famille, Baholy, Mahandry, Mandresy et Mahatoky.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ici les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse de doctorat.

Madame RAZANAMPARANY Julia Louisette, Professeur au Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'ANTANANARIVO, pour qui je suis très reconnaissant de bien vouloir présider le jury de cette thèse malgré ses nombreuses responsabilités.

Monsieur ANDRIANTSIMAHAVANDY Abel A, Professeur au Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'ANTANANARIVO, Rapporteur interne, et Monsieur RAKOTOZANDRINDRAINY Raphael, Professeur à l'Ecole d'Enseignement Supérieur des Sciences Agronomiques, Université d'ANTANANARIVO, qui ont bien voulu porter un intérêt et consacrer une partie de leur précieux temps pour apporter leurs compétences respectives dans ce travail.

Monsieur RASAMBAINARIVO Jhon Henri, Professeur au Département d'Enseignement des Sciences et des Médecines Vétérinaires, et Monsieur RAMANAKIERANA Heriniaina, Docteur HDR au Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'ANTANANARIVO d'avoir bien voulu examiner aimablement mon travail et faire partie du jury malgré leurs lourdes occupations.

Mes Directeurs de thèse, Monsieur RAHERIMANDIMBY Marson, Professeur au Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'ANTANANARIVO, Doyen de la faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo et Monsieur ALBINA Emmanuel, Directeur de Recherche/HDR, à l'Unité Mixte de Recherche 15 (UMR15) - Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes Montpellier. Je ne serai pas arrivé jusque-là sans l'aide du Pr RAHERIMANDIMBY Marson qui m'a suivi depuis mon DEA et pour la qualité de ses conseils. Docteur ALBINA Emmanuel, ce sujet de thèse que vous m'avez proposé me convient. J'ai été bien accueilli et bien encadré dans votre laboratoire à Montpellier.

Mon encadreur MICHAUD Vincent, qui m'a suivi tout au long de ces années d'étude à Montpellier ou de loin à Madagascar. A travers nos discussions et les critiques, vous m'avez apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet. Et j'espère ne pas vous avoir trop déçu.

Dr Rabenarivahiny René, responsable du laboratoire national Vétérinaire et toute l'équipe du LNDV, qui m'ont donné une chance de continuer la recherche. Sincères remerciements !

Monsieur MARTINEZ Dominique, Directeur de l'Unité Mixte de Recherche 15 (UMR15)- Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes Montpellier de m'avoir accueilli dans son laboratoire à Montpellier.

Tous les membres de l'UMR15 ainsi que les stagiaires, en particulier I Rakotoarivony, K Valère, Denise B, Geneviève L, Cécile M, Catherine C, Vincent M, Samia G, Habib S, Martin D, Holtz C et Olivier K pour leurs aides spontanées pendant mes séjours à Montpellier. Grand merci !

Tous les Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo - filière Sciences Naturelles ; sans qui, je ne serai pas à ce niveau. Merci de m'avoir offert vos connaissances.

TABLE DES MATIERES

AVANT- PROPOS	2
DEDICACES	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	5
GLOSSAIRE	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES PUBLICATIONS ET ANNEXES	14
LES AUTRES PUBLICATIONS, CONFERENCES ET POSTERS EN RELATION AVEC LE SUJET	15
Chapitre I : INTRODUCTION	16
Chapitre II : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	20
I. La peste porcine africaine.....	21
1. Historique et distribution géographique	21
2. Impact économique	26
3. Signes cliniques et lésions	27
4. Pathogénie	29
II. Etiologie de la maladie	31
1. Classification	31
2. Morphologie et structure du virus	32
3. Organisation du génome et protéines codées.....	33
4. Entrée du virus dans la cellule cible	35
5. Replication du virus.....	36
5.1. Transcription et traduction des gènes.....	37
5.2. Morphogénèse.....	38
5.3. Libération des virions néoformés.....	40
6. Epidémiologie	40
7. Réponse immune et protection chez le porc domestique.....	44
8. Echappement au système immunitaire de l'hôte	46
9. Persistance et résistance du virus PPA	47
III. Prophylaxie – lutte contre la maladie.....	48
IV. Diagnostic.....	49
1. Diagnostic clinique.....	49
2. Diagnostic de laboratoire.....	50
V. Nature et objectifs de cette étude	52

1. Contexte	52
2. Problèmes rencontrés dans les pays tropicaux.....	56
3. Objectif de l'étude	56
Chapitre III : TRAVAUX DE RECHERCHE	58
I. Matériels et méthodes.....	59
1. Echantillons	59
1.1. Echantillons prélevés lors des études expérimentales	60
1.2. Echantillonnage « terrain »	61
2. Influence de la taille du fragment de papier filtre sur la détectabilité du virus PPA	64
3. Traitement des échantillons	64
3.1. Analyses sérologiques : détection des anticorps dirigés contre le virus PPA par la méthode ELISA.....	64
3.2. Détection moléculaire du virus PPA.....	65
3.2.1. <i>Extraction des acides nucléiques à partir des organes de porc et de sang prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA</i>	65
3.2.2. <i>Amplifications géniques</i>	65
3.2.2.1. Amplification génique par PCR conventionnelles.....	65
3.2.2.1.1. <i>PCR directe sur papier filtre imprégné de sang de porc</i>	66
3.2.2.1.2. <i>PCR sur acides nucléiques extraits d'organes de porc</i>	66
3.2.2.2. Amplification génique en temps réel	67
3.3. Isolement viral	68
4. Détermination de la viro-prévalence et de la séro-prévalence de la PPA à Madagascar	69
5. Caractérisation moléculaire des virus PPA malgaches.....	70
5.1. Amplification des gènes cibles	70
5.2. Clonage des amplicons – sélection des clones bactériens – préparation d'ADN plasmidique	71
5.3. Séquençage des gènes d'intérêt	72
5.4. Reconstructions phylogénétiques.....	72
II. RESULTATS	74
1. Evaluation du papier filtre comme support de prélèvement pour le diagnostic.....	74
1.1. Influence de la taille du fragment de papier buvard.....	74
1.2. Sensibilité	75
1.2.1. <i>Limite de détection</i>	75
1.2.2. <i>Impact du support de prélèvement</i>	75
1.3. Sérologie	77
2. Analyse des prélèvements provenant des infections expérimentales:	78
2.1. Expérimentation animale réalisée au CISA	78
2.2. Expérimentation animale effectuée au CReSA :	79

2.3. Expérimentations animales réalisées à l'ANSES	82
2.4. Bilan de la détection du virus à partir des prélèvements réalisés lors des études expérimentales	84
3. Analyse des échantillons « terrains »	87
3.1. Echantillons provenant de Madagascar.....	87
3.1.1. Détermination séroprévalence du virus PPA à Madagascar par ELISA.....	87
3.1.2. Détection moléculaire du virus PPA.....	88
3.2. Analyse des prélèvements provenant de Côte d'Ivoire	76
3.2.1. Détection moléculaire de l'ADN du virus PPA	76
4. Caractérisation moléculaire de souches malgaches	77
4.1. Analyse des séquences partielles du gène B646L qui code pour la protéine capsidiale VP72	77
4.2. Analyse des séquences du gène KP177R.....	79
4.3. Analyse du gène CP204L	81
Chapitre IV :DISCUSSION	83
1. Validation des techniques de détection de la PPA en utilisant le papier buvard Whatman 3MM.....	84
2. La peste porcine africaine et la circulation à Madagascar	90
3. Caractérisation moléculaire de virus malgaches.....	91
4. Epidémiologie	93
Chapitre V : CONCLUSION et PERSPECTIVES	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101

GLOSSAIRE

Epizootie : maladie contagieuse frappant, dans une région plus ou moins vaste, une espèce animale ou un groupe d'espèces dans son ensemble

Fokontany : A l'origine, village traditionnel malgache. Aujourd'hui, subdivision administrative de base malgache. Il comprend soit des hameaux, des villages, des secteurs ou des quartiers

Incidence : Nombre de nouveaux cas d'une pathologie observés pendant une période et pour une population déterminée. Critères les plus importants pour évaluer la fréquence et la vitesse d'apparition d'une pathologie, exprimés généralement en pourcentage

Kisoa gasy ou kisoa zanatany : Porc de race locale

Prévalence : Mesure de l'état de santé d'une population à un instant donné. Pour une affection donnée, elle est calculée en rapportant à la population totale, le nombre de cas de maladies présents à un moment donné dans une population, exprimée généralement en pourcentage

LISTE DES ABREVIATIONS

µl	Microlitre
aa	Acide Aminé
ADN	Acide désoxoribonucléique
Ac	Anticorps
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANSES	Agence Nationale de sécurité Alimentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger ou ARN messenger
ASFV	African swine fever virus
CIRAD	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Montpellier-France)
CISA	Centro de Investigacion in Sanidad Animal
CNEVA	Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires
C-terminale	Extrémité carboxylée des peptides ou protéines
CReSa	Centre de Recerca en Sanitat Animal, Barcelone, Espagne
Ct	Threshold cycle
dsDNA	Double stranded Acide désoxoribonucléique
DSV	Direction des services vétérinaires
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EMEM	Eagle Minimum Essential Medium
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EOPS	Exempts d'organismes pathogènes spécifiques
FAO	Food and Agricultural Organization: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
h	Heure
HA	Hémadsorption
IB	Immunoblotting
IFD	Immunofluorescence directe
IFI	Immunofluorescence indirecte
Ig	Immunoglobuline
IC	Indice de confiance
ICTV	Comité international de la taxonomie des virus

IPM	Institut Pasteur de Madagascar
kDa	Kilo Dalton
kpb	Kilo paire de base ou 1000 pb
LNDV	Laboratoire national de diagnostic vétérinaire
MEM	Minimum Essential Medium
MGF	Multiple genomic family
min	Minute
nt	Nucléotide
C-terminale	Extrémité aminée des peptides ou protéines
°C	Degrés Celsius
OIE	Office international des épizooties ou Organisation Mondiale de la Santé animale
ORF	Open Reading Frame
OVI	Onderstepoort Veterinary Institute
PCT	Projet de coopération technique
PPA	Peste porcine africaine
PPC	Peste porcine classique
pb	Paire de base
PBS	Phosphate buffer saline ou solution tamponnée de phosphate
PCR	Polymerase chain reaction
PM	Poids moléculaire
QPCR	PCR en temps réel ou quantitative
U	Unité
UPL	Universal Probe Library
UV	Ultra-violet
TAE	Tris Acetate EDTA
VPN	Valeur prédictive d'un résultat négatif
VPP	Valeur prédictive d'un résultat positif
v/v	Volume à volume

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Distribution de la peste porcine africaine dans le monde en 2014 (WAHID OIE, 2014: <http://web.oie.int/wahis/maps/temp/133009177230081.png>).
- Figure 2 : Oreille cyanosée
- Figure 3 : Ventre cyanosé
- Figure 4 : Pétéchie au niveau du rein
- Figure 5 : Rate hypertrophiée
- Figure 6 : Ganglions hémorragiques
- Figure 7 : Hémorragie de l'intestin
- Figure 8 : Lésions évocatrices de la peste porcine africaine
- Figure 9 : Reconstruction phylogénétique regroupant les familles des grands virus à ADN nucléo-cytoplasmiques (*Fischer et al., 2010*)
- Figure 10 : Virus de la peste porcine africaine : (a) Structure schématique d'un Asfivirus; (b) vue au microscope électronique avec coloration négative (© Swiss Institute of bioinformatics).
- Figure 11 : Structure du génome viral du virus PPA. (A) ADN viral de la souche BA71V dont les séquences terminales inversées et répétées (TIR) se terminent par des structures en épingle à cheveux (EC). (B) Détail des épingles à cheveux composées de structure secondaire de 37 nucléotides. (C) Structure des extrémités inversées et répétées. (Maria L Salas, 1999)
- Figure 12 : Attachement du virus PPA sur les cellules vu au microscope électronique avec coloration négative. (VE) particule virale extra - cellulaire, (VI) particule virale intracellulaire, (MP) membrane plasmique (Maria L Salas, 1999)
- Figure 13 : Cycle de la réplication virale. 1 : pénétration par endocytose, 2 : désencapsidation de l'ADN et libération des enzymes virales permettant l'expression des gènes précoces, 3 : réplication du génome au niveau de sites périnucléaires « usines à virus », 4 : expression des gènes tardifs, 5 : Assemblage des virions, 6 : bourgeonnement à la membrane cellulaire des virions néoformés ou libération par lyse cellulaire. (Gavin Bowick, Institute for Animal Health)
- Figure 14 : Cycle de transmission du virus de la PPA chez les différents hôtes (les porcs domestiques, les porcs sauvages et les tiques molles)
- Figure 15 : Un porc de race locale
- Figure 16 : Porc en divagation à Ambatondrazaka
- Figure 17 : Sites de prélèvement à Madagascar au cours des années 2008 à 2010
- Figure 18 : Sites de prélèvement au Côte d'Ivoire au cours des années 2009 à 2010
- Figure 19 : Amplification d'un fragment de 346 pb du gène B646L par PCR conventionnelle : impact de la taille du fragment de papier buvard utilisé sur la détection moléculaire. La taille des fragments permettant la détection est comprise entre 0,3 et 5 mm². T+(1) : témoin positif extrait d'ADN ; T+(2) : témoin positif papier filtre ; T- : témoin négatif eau; M : marqueur de poids moléculaire 100 pb.
- Figure 20 : Visualisation des fragments de 478 pb du gène B646L amplifiés entre le couple d'amorces VP72d et VP72-U à partir d'ADN extrait de sang total (migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5% en TAE 1X). Prélèvements réalisés à l'ANSES à J45 post infection : n° 1 : 110 ; 2 : 135 ; 3 : 157. T+ : témoin négatif ; T- : témoin positif. MP : marqueur de poids moléculaire

- Figure 21 : Visualisation des fragments de 346 pb du gène B646L amplifiés entre le couple d'amorces VP72sens /VP72rev à partir de fragment de papier buvard imbibé de sang (migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5% en TAE 1X), prélèvements réalisés à l'ANSES à J45 post infection : n° 1 :110 ; 2 :135 ; 3 :157. T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif. MP: marqueur de poids moléculaire
- Figure 22 : Communes où les prélèvements de sérum ont été effectués en 2008 et 2009 et présentant l'échantillon séropositif
- Figure 23 : Communes dans lesquelles ont été effectués les prélèvements d'organe et de sang séchés sur papier filtre 3MM de 2008 à 2010, et résultats de détection du virus PPA
- Figure 24 : Arbre phylogénétique construit en maximum de vraisemblance avec le modèle TN93 et décrivant les relations entre 91 isolats de virus PPA en provenance d'Afrique et d'Europe, d'Amérique du sud et des Caraïbes en ce qui concerne le gène B646L (capside virale). Les 22 génotypes sont représentés. Les séquences malgaches (colorées dans la figure, la couleur rouge correspondant aux séquences générées au cours de cette étude) sont situées au sein du génotype II. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 sont indiquées en face du nœud correspondant. L'échelle représente la quantité de diversité entre les isolats au sein de l'arbre.
- Figure 25 : Arbre phylogénétique (Maximum de vraisemblance) enraciné donnant les relations entre les gènes KP177R (p22) du virus PPA en provenance de Madagascar comparé avec ceux des banques d'Afrique et d'Europe. Les valeurs des bootstraps >50% figurées en face du nœud correspondant ont été calculées après 1000 répétitions. L'échelle indique l'éloignement des isolats dans la matrice de distance. Les souches malgaches de cette étude sont colorées en rouge
- Figure 26 : Arbre phylogénétique (Maximum de vraisemblance) enraciné donnant les relations entre les gènes CP204L (p30) du virus PPA montrant les souches malgaches au sein des 22 génotypes en provenance d'Afrique et d'Europe. Les valeurs des bootstraps >50% figurées en face du nœud correspondant ont été calculées après 1000 répétitions. L'échelle indique l'éloignement des isolats dans la matrice de distance. Les souches malgaches sont colorées en rouge (cette étude) et bleue (avant cette étude).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Comparaison des types d'élevage porcin à Madagascar
Tableau 2 :	Nature et lieu de prélèvement des échantillons collectés à Madagascar et au Côte d'Ivoire entre 2008 et 2010
Tableau 3 :	Comparaison de la sensibilité de détection du virus PPA à partir de papier filtre 3MM et de sang total par PCR conventionnelle directe, PCR UPL temps réel directe et isolement viral
Tableau 4 :	Détection d'anticorps dirigés contre le virus PPA : comparaison des résultats de sérologie obtenus à partir de sang séché sur papier buvard et à partir de sérum. IC ₉₅ : intervalle de confiance à 95%. VPP : valeur prédictive positive. VPN : valeur prédictive négative. Kappa : concordance des résultats obtenus avec les deux méthodes de prélèvement.
Tableau 5 :	Comparaison des résultats de la détection moléculaire du virus PPA par PCR conventionnelle directe entre sang EDTA / FTA / 3MM effectués au CISA
Tableau 6 :	Comparaison des résultats PCR à temps réel (TaqMan et UPL) sur 3MM effectué au CISA
Tableau 7 :	Résultats de la détection du virus PPA par PCR en temps réel (TaqMan et UPL) à partir des prélèvements de sang et de buvards 3MM imbibé de sang complet réalisés lors de l'expérimentation effectuée au CReSa utilisant la souche Ben97/1 lors de l'épreuve infectieuse.
Tableau 8 :	Résultats de la détection du virus PPA par PCR en temps réel (TaqMan et UPL) à partir des prélèvements de sang et de buvards 3MM imbibé par sang complet lors de l'expérimentation effectuée au CReSa utilisant la souche E75 lors de l'épreuve infectieuse.
Tableau 9 :	Résultats de la détection moléculaire du virus PPA à partir de sang séché sur papier filtre 3MM par PCR (conventionnelle directe, Taqman et UPL) chez les porcs après la « vaccination » par la souche OURT88/3 et épreuves infectieuses avec les souches OURT88/1 et Benin 97/1. Les prélèvements manquants à J49 sont la conséquence de la mort des animaux suivant la seconde épreuve infectieuse. Pour la lisibilité de ce tableau, les résultats de détection à partir de sang complet ne sont pas indiqués. Ils sont cependant identiques à ceux obtenus à partir du sang séché sur papier filtre 3MM.
Tableau 10 :	Expérimentation animale n°2 réalisée à l'ANSES : comparaison de la détection moléculaire du virus PPA à partir d'ADN extrait de sang total ou à partir de sang séché sur papier filtre au moyen des PCR Taqman King et UPL. Les échantillons manquant à J42 post épreuve infectieuse font suite à l'euthanasie des animaux pour raison éthique. La PCR UPL montre une meilleure sensibilité de détection lorsque la détection est réalisée à partir de sang séché sur papier filtre 3MM.
Tableau 11 :	Tableau récapitulatif des résultats de détection du virus PPA à partir des prélèvements effectués lors des différentes expérimentations animales. Les PCR conventionnelles directes, temps réel « Taqman » et « UPL » ont été réalisées à partir de 237 prélèvements, la détection des anticorps dirigés contre la protéine virale VP72 dans 46 prélèvements (dont 16 supposément positifs selon le protocole expérimental), et la mise en évidence du virus vivant par isolement à partir de 157 prélèvements
Tableau 12 :	Résultats sérologiques effectués chez les sérums de porcs collectés en 2008 - 2009
Tableau 13 :	Comparaison des PCR conventionnelle et temps réel UPL et King réalisé à partir de sang séché sur du papier buvard 3MM et d'ADN extrait de rates de porc prélevés à Madagascar en 2009.
Tableau 14 :	Les différents isolats exploitables dans cette étude

LISTE DES PUBLICATIONS ET ANNEXES

- ANNEXE 1: African Swine Fever Diagnosis Adapted to Tropical Conditions by the Use of Dried-blood Filter Papers (Randriamparany et al., 2014)
- ANNEXE 2: Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of African Swine Fever Virus: Proposal for a New Classification and Molecular Dating of the Virus (Michaud et al., 2013)
- ANNEXE 3 Tableau 14 : Les différents isolats exploités lors de cette étude.

LES AUTRES PUBLICATIONS, CONFERENCES ET POSTERS EN RELATION AVEC LE SUJET

1. **Randriamparany T.**, Grenier A., Tourette I., Maharavo RCY., Rousset D., Lancelot R. Situation épidémiologique de la peste porcine africaine dans la région du lac Alaotra (Madagascar) et conséquences pour l'organisation de la lutte et de la surveillance. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 2005, 58 (1-2) : 15-20
2. Gonzague M., Roger F., Rousset D., **Randriamparany T.**,Crucière C. Detection of the african Swine Fever genomic DNA on dried pig blood filter paper. *The Journal of applied research in Veterinary Medecine*. 2003
3. **Randriamparany T.** Evaluation des techniques virologiques (Elisa Capture et PCR) et sérologique pour le dépistage et le diagnostic de la peste porcine Africaine à Madagascar. Mémoire de DEA ; *Université d'Antananarivo*. 2001.60 p.
4. Rousset D., **Randriamparany T.**, Maharavo Rahantamalala CY., Randriamahefa N., Zeller H., Rakoto-Andrianarivelo M., Roger F. Introduction de la Peste Porcine Africaine à Madagascar, histoire et leçon d'une émergence. *Arch Inst Past de Madagascar* 2001 ; (1&2) : 31-33.
5. Gonzague M., Roger F., Bastos A., Burger C., **Randriamparany T.**, Smondack S., Crucière C. Isolation a non – hemadsorbing, non – cytopathic strain of african swine fever virus in Madagascar. *Epidemiol.Infect* 2001. 126: 453-59.
6. **Randriamparany T.**, Michaud V., Albina E. 2010. Diagnostic de la peste porcine africaine (PPA) et diversité génétique du virus Malgache chez les porcs domestiques.*Séminaire Santé animale*.Ankerana – Antananarivo
7. Albina E, Michaud V, **Randriamparany T.** 2010. Comparaison papier buvard FTA et Whatman 3MM pour la detection de la PPA. Epizone. Italy
8. Costard, S.; **Randriamparany, T.**; Humbert, C.; Franco, S.; Rasamoelina, H.; Rakotoharinome, M.; Rakotondrahanta, S.; Albina, E.; Roger, F.; Pfeiffer, D.U. 2009. Estimating the prevalence of African swine fever in Madagascar. Paper presented at the 12th conference of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Durban, South Africa, 10-14 August 2009. Nairobi (Kenya)
9. **Randriamparany T.**, Michaud V., Albina E., Costard S. Résultats préliminaires de l'étude épidémiologique du cycle sylvatique de la peste porcine africaine à Madagascar. Réunion annuelle du projet Wellcome Trust à Pretoria, Afrique du Sud, 2009.
10. **Randriamparany T.** Prevalence survey of African Swine Fever in Madagascar. Third annual meeting of Wellcome trust Project. Madrid, 25-26 October 2007
11. Costard S., Pfeiffer D., Roger F., Vidon H., Rakotoharinome M., Ravaomanana J., **Randriamparany T.**, Jori F., Vial L., Wieland B. Epidemiological Studies of African Swine Fever in Madagascar. 2007.
12. Maharavo RCY., **Randriamparany T.**, Rousset D., Rakoto-Andrianarivelo M. Situation de la peste porcine Africaine à Madagascar. Colloque « Santé, environnement et développement ». *Centenaire de l'Académie Nationale des Arts, des lettres et des Sciences*. Antananarivo – Madagascar, 24-25 juillet 2002.
13. Roger F., Diallo A., Rousset D., Ratovonjato J., **Randriamparany T.**,Uilenberg G., Randriamahefa N., Maharavo RCY., De Ruyter T., Stark K., Cruissière C., Sanchez-vizcaino JM., Goutard F. Epidemiological features of African Swine fever in Madagascar.*Society for Tropical Veterinary Medecine and the Wildlife Disease Association International Joint Conference*.South Africa, 22-27 july 2001.
14. Roger F., Crucière C., Randriamahefa N., Zeller H., Uilenberg G., **Randriamparany T.**, Gonzague M., Benkirane A., Diallo A. African swine fever in Madagascar : Epidemiological assessment of the recent epizootic. *In proceedings of the IXth Intenational Symposium of Veterinary Epidemiology and Economic* (ISVEE). Breckenridge, Colorado, USA. 2000 ; ID 194.

Chapitre I

INTRODUCTION

L'élevage contribue à la sécurité alimentaire des populations humaines, que ce soit par un accès direct à des sources de protéines carnées ou grâce aux revenus que cette pratique génère. Le porc, dont la viande est la plus consommée au monde (40% de la totalité de la viande produite), a vu la population de son cheptel mondial doubler depuis les années 1970. Elle avoisine en 2015 selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) le 1 000 000 000 de têtes pour une production estimée à 112 millions de tonnes (MT). Même si la porciculture est principalement réalisée là où la demande est forte, c'est-à-dire en Asie, (qui concentre plus de la moitié du cheptel, dont la majorité en Chine avec 57 MT), en Europe (22 MT) et en Amérique du Nord (11 MT), en Afrique, avec seulement 0,25 MT le Nigéria qui compte la population porcine la plus importante. Si la prospérité de l'élevage porcin induit le développement de toute la filière, de la même manière les risques que court cet élevage constituent un danger pour la filière porcine dans son entier, avec des conséquences socio-économiques très importantes.

Parmi ces risques, les différentes maladies susceptibles de toucher les porcs constituent un réel problème pour le développement de l'élevage, en termes de maintien d'activité comme en termes d'investissements. Ces maladies, dans la majorité des cas, font partie des préoccupations majeures des états dans les pays où elles sévissent. Parmi ces maladies touchant le porc, l'une est particulièrement en expansion ces dernières années : la peste porcine africaine.

Très contagieuse, la PPA est causée par un virus à ADN double brin appartenant à la famille *Asfarviridae* et au genre *Asfivirus*. Le virus infecte tous les suidés domestiques et sauvages et est à l'origine d'épidémie très sévère avec des taux de morbidité et de mortalité respectifs de 90% et 100% (Dixon *et al.*, 2004 ; Zsak *et al.*, 2005).

Depuis sa connaissance en 1921, sa capacité destructrice a été pleinement évaluée quand, en 1957, la maladie a fait sa première apparition en dehors du continent africain. Des pertes lourdes ont été enregistrées dans des zones de forte production porcine en Europe et ultérieurement aux Caraïbes et au Brésil. Plusieurs milliards de dollars ont été dépensés pour éradiquer la maladie dans ces régions et plus de trente ans ont été nécessaires pour rendre la péninsule ibérique indemne. En Afrique, la réémergence de la maladie en 1994 a décimé la production porcine dans de nombreux pays. Son très haut pouvoir de dissémination à travers les frontières met en exergue le risque d'apparition de la PPA en dehors du continent africain. Ce risque a été confirmé en 2007 avec l'introduction

de la PPA dans la Caucase depuis l'Afrique de l'est, probablement via les déchets de cuisine d'un bateau de commerce. La lutte contre la PPA est donc une priorité aussi bien dans les régions affectées que sur le plan international.

A l'heure actuelle, le contrôle de la PPA ne peut se faire que par des mesures sanitaires puisque le traitement et le vaccin efficace ne sont pas encore disponibles. La lutte est complexe et repose sur des mesures exclusivement sanitaires (abattages, limitation des mouvements des porcs,...). L'absence de prophylaxie médicale et de traitement de la maladie exigent l'importance d'un diagnostic rapide afin de pouvoir contrôler et éradiquer la maladie.

Cependant, les moyens de la lutte contre les maladies animales varient d'un pays à l'autre, et cela en fonction de l'aptitude technique et financière du pays en question. Pourtant, les pays en difficulté économique sont vulnérables aux différentes maladies animales. Ce travail de thèse veut apporter des améliorations pour pallier à certaines difficultés rencontrées dans le cadre de l'élaboration et de l'amélioration de la lutte contre la PPA qui est aussi l'une des préoccupations majeures des Services Vétérinaires Malgaches. Il a pour objectif principal de développer un outil de diagnostic adapté aux pays tropicaux par utilisation des papiers buvards. Il s'agit d'évaluer les capacités du papier buvard Whatman 3MM pour détecter et évaluer la prévalence du virus PPA, en utilisant des tests de diagnostic classique conventionnels adaptés à des prélèvements standards (sang, sérum et organe).

En vue d'avoir une meilleure connaissance sur l'aptitude des papiers buvards, des échantillons ont été collectés lors des enquêtes sur terrain effectuées à Madagascar (2008 – 2010) et en Côte d'Ivoire (2009 – 2010) ainsi que lors des études expérimentales effectuées dans trois laboratoires de recherche en Europe : ANSES (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Ploufragan, France), CReSa (Centre de Recerca en Sanitat Animal, Barcelone, Espagne) et CISA (Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid) en 2009 – 2011.

Pour la détection, nous avons utilisé des techniques de PCR conventionnelle, de PCR quantitative en temps réel, d'isolement viral et le test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Le test ELISA permet par la recherche d'anticorps spécifiques de dépister le passage du virus PPA dans un porc. Les trois dernières techniques permettent de rechercher le virus (analyse virologique) dans les matériels

biologiques ou sur papier buvard. Pour la caractérisation des virus circulants, l'analyse de séquences a été effectuée.

Ce document comporte cinq chapitres composés de:

- Chapitre I : Introduction
 - Chapitre II : Revue bibliographique et contexte sur la maladie de la Peste porcine africaine
 - Chapitre III : Travaux de recherche
 - Chapitre IV : Discussion
 - Chapitre V : Perspectives et conclusion
- ainsi que de la liste des références bibliographiques et les publications citées en annexes.

Chapitre II

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La peste porcine africaine

1. Historique et distribution géographique

La peste porcine africaine (PPA) est une maladie virale contagieuse et transmissible des suidés domestiques et sauvages. Cette maladie a été décrite pour la première fois au Kenya en 1921 par Montgomery (Montgomery, 1921). Il suspectait que ce virus provenait des suidés sauvages, les phacochères, qui auraient ensuite propagé le virus chez les porcs domestiques (Plowright, 1986). Cette description était basée sur l'observation d'une quinzaine de foyers, répertoriés durant les quinze années précédentes, et ayant provoqué la mort de près de 100% des animaux atteints (Penrith, 2009). Montgomery l'a décrite comme une maladie subaiguë des porcs causée par un agent viral, et entraînant la mort très tôt après l'apparition des symptômes. Déjà, il avançait l'absence de protection des porcs par immunisation passive.

Par la suite, la circulation ancienne du virus dans les populations de suidés sauvages africains a été démontrée chez les phacochères (*Phacochoerus africanus*) et chez les potamochères (*Potamochoerus porcus*) (Mur *et al.*, 2012), ainsi que dans les tiques molles du genre *Ornithodoros* (*O. porcinus* et *O. moubata*) présentes dans l'est et le sud de l'Afrique. Le passage entre populations de tiques et de suidés sauvages constitue le cycle sauvage (ou selvatique) du virus (Thomson, 1980). Parallèlement à ce cycle sauvage, le virus suit aussi un cycle dit domestique au cours duquel il est transmis directement par contact entre les porcs domestiques (Lubisi *et al.*, 2005). Chez les suidés domestiques, outre la transmission directe entre animaux ou par le biais des tiques molles vivant dans leur habitat, l'infection peut survenir par contact direct avec du matériel contaminé ou par ingestion de nourriture infectée (Penrith *et al.*, 2004). Aussi, dans les pays qu'elle affecte, la maladie peut s'établir de différentes manières. La réémergence de la PPA en 1951 puis en 1973 en Afrique du Sud, suivant des périodes inter-épizootiques de respectivement 12 et 10 ans, a révélé l'existence d'un cycle selvatique du virus lui ayant permis de se maintenir dans la faune sauvage entre les périodes d'épizootie (Pini, 1975). Au contraire, en Angola, la persistance du virus serait plus vraisemblablement due à une modération de sa virulence consécutive à une longue et importante circulation entre porcs domestiques (Plowright, 1981).

Suite aux foyers survenus au début du XX^{ème} siècle, l'épidémie s'est étendue à la quasi-totalité de l'Afrique sub-saharienne (Figure 1).

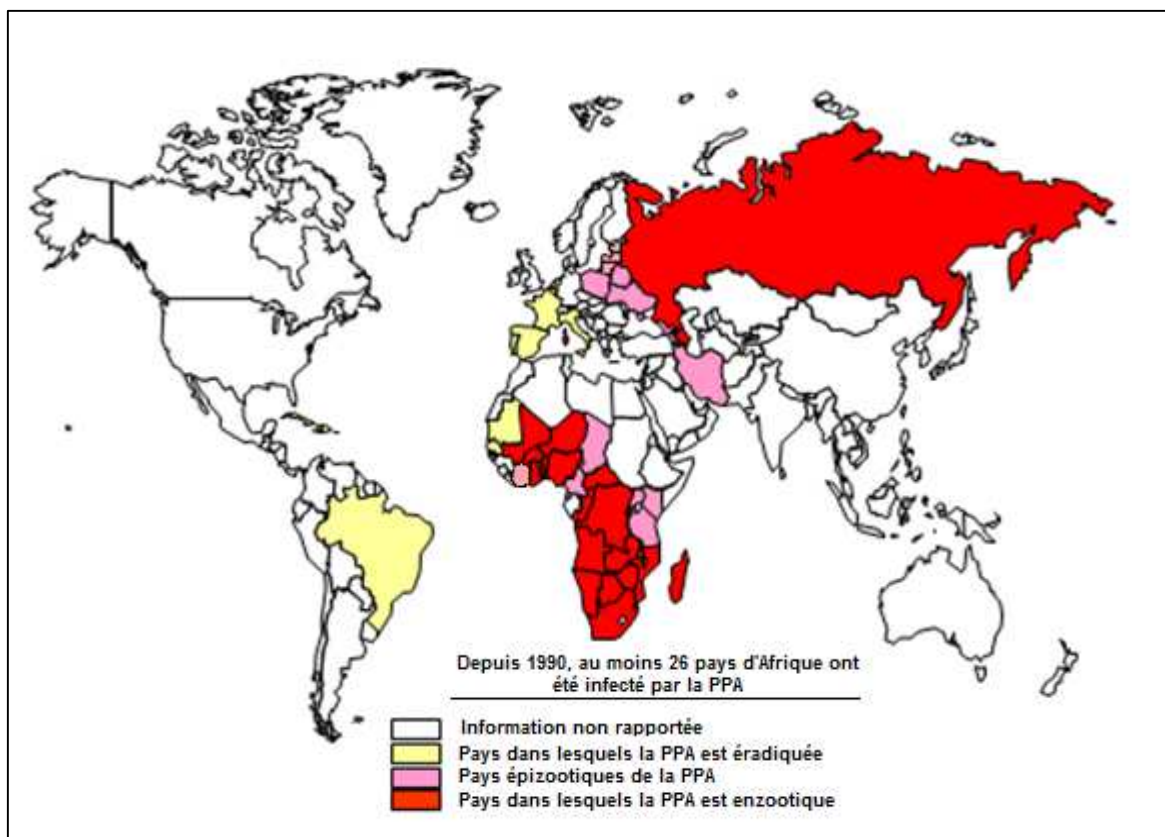


Figure 1 : Distribution de la PPA dans le monde en 2014 (WAHID OIE, 2014: <http://web.oie.int/wahis/maps/temp/133009177230081.png>).

La maladie a été mise en évidence dans la majorité des pays d'Afrique australe et d'Afrique de l'est, où elle est considérée comme enzootique au Kenya, en Zambie, au Malawi, en Angola, en Afrique du Sud et au Mozambique. Par la suite, à partir de l'Afrique de l'est, la PPA s'est rapidement propagée à de nombreux pays d'Afrique de l'Ouest : la Guinée-Bissau, le Sénégal, le Cap Vert, le Cameroun, et probablement la Gambie et le Nigéria, ont été infectés à partir de la fin des années 1950 et ce, jusqu'au début des années 1980. Dans ces pays, la PPA a diffusé dans la majorité des élevages porcins et est devenue enzootique (FAO, 1998a). De plus, des introductions uniques ou sporadiques ont été rapportées au Soudan, au Tchad, et à Sao Tomé à la fin des années 1970 et 1980 (Sanchez-Botija, 1982). Pendant les années 1990, une forte augmentation de l'activité de la PPA dans toute l'Afrique sub-saharienne a été observée avec une nouvelle période d'émergence en Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire, Bénin, Togo, Ghana et Burkina Faso) (Penrith *et al.*, 2004), dans des pays où la PPA n'avait jamais été jusqu'alors observée. L'analyse

phylogénétique des isolats responsables de ces foyers a montré une filiation avec ceux collectés dans les années 1950 lors de la première vague de PPA en Afrique de l'Ouest (Bastos *et al.*, 2003). Une circulation enzootique à bas bruit dans la région a été suggérée sur une période d'au moins 40 ans due à la maintenance du virus dans le cycle selvatique (tiques et/ou suidés sauvages). Cette circulation aurait été possible de par la faiblesse, voire l'absence de mesures de contrôle adaptées (i.e. veille sanitaire et mesures de biosécurité dans les élevages) dans des pays économiquement faibles. Parmi ces pays, seule la Côte d'Ivoire a réussi à éradiquer la maladie (El Hicheri *et al.*, 1998). Cependant, elle vient d'être à nouveau atteinte par le virus en septembre 2014. La première hypothèse de la réémergence de la PPA en Côte d'Ivoire a été celle de la distribution d'eaux grasses provenant d'un bateau lituanien mouillé dans le port de San Pedro (OIE, 2014). Cependant, le génotypage de la souche virale l'a classée dans le génotype I (communication personnelle), invalidant cette hypothèse puisque la souche circulant dans le nord de l'Europe appartient quant à elle au génotype II (Rowlands *et al.*, 2008).

En 1957, un foyer fut rapporté pour la première fois hors du continent africain, à Lisbonne, au Portugal (Manso Ribeiro and Azevedo, 1961). L'introduction du virus dans les élevages porcins a fait suite à la distribution aux animaux d'eaux grasses provenant d'un avion de ligne assurant la liaison Angola – Portugal. La maladie s'y est manifestée dans sa forme suraiguë, avec une mortalité des porcs domestiques proche de 100% (Manso Ribeiro *et al.*, 1958). En 1960, la maladie fait sa réapparition près de Lisbonne, traverse le Portugal et envahit toute la péninsule ibérique. Des foyers erratiques se déclareront ensuite dans d'autres pays européens : France (1964, 1967, 1974), Italie (1967, 1968, 1969), dont la Sardaigne (1978), Malte (1978), Belgique (1986) et Pays-Bas (1986). Partout, ces foyers ont été maîtrisés grâce à une politique d'abattage systématique, à l'exception de la Sardaigne où la maladie est devenue depuis endémique. Le Portugal et l'Espagne, quant à eux, sont restés contaminés de manière endémique jusqu'à la fin des années 1990, avec un dernier foyer observé au Portugal en 1999 (OIE, 2000), puis déclarés indemnes au début des années 2000.

Partant d'Europe, le virus a traversé l'Océan Atlantique en suivant les voies commerciales pour atteindre et se diffuser dans les Caraïbes par Cuba (1971), la République Dominicaine (1978 à 1980) et Haïti (1978 à 1984), pour enfin gagner le continent américain par le Brésil (1978 à 1981). Là aussi, l'infection a pu être éradiquée au

cours des années 1980 par une politique d'abattage massif des animaux (Ayoade *et al.*, 2003 ; Crucièrè, 2003 ; Penrith *et al.*, 2004).

La maladie a quitté le continent africain *stricto sensu* à nouveau en 1997-98 pour atteindre Madagascar, où elle est depuis devenue endémique (Gonzague *et al.*, 2001). De là, en 2007 elle gagne la République de Maurice (Lubisi *et al.*, 2009) et de nouveau l'Europe par la Géorgie (Beltran-Alcrudo *et al.*, 2008 ; Rowlands *et al.*, 2008). Là encore, des eaux grasses provenant de navires marchands sont source probable de la contamination. La maladie se propage alors rapidement aux autres pays du Caucase (Arménie et Azerbaïdjan, 2007), atteint l'Iran en 2009 via des sangliers sauvages, puis la Russie en 2010 où elle se propage, notamment vers l'ouest. Elle franchit les frontières ukrainiennes en 2012 et biélorusses en 2013 (Le Potier et Marcé, 2013) et, malgré les mesures d'abattage massif mises en œuvre, la maladie s'est maintenue dans ces pays depuis son introduction. En 2014, des sangliers sauvages morts de PPA sont trouvés en Pologne, en Lettonie et en Lituanie, préfigurant une dissémination de la maladie en Europe via la faune sauvage (Gallardo *et al.*, 2014). En juillet 2014, la PPA atteint non seulement les sangliers sauvages et les porcs domestiques en divagation en Europe du Nord, mais aussi des zones d'élevage intensif. Enfin, en septembre 2014, le dernier des pays baltes, l'Estonie, a été à son tour atteint. Depuis lors, plusieurs centaines de foyers ont été déclarés dans ces pays, tant dans la faune sauvage que dans les élevages de porc domestique.

De par son très grand pouvoir de diffusion, y compris au-delà des frontières nationales, et les graves conséquences socio-économiques qu'elle entraîne dans la filière agro-alimentaire de production, de transformation et de commerce des régions qu'elle atteint, la PPA est une maladie majeure du porc domestique dont la déclaration est obligatoire (ex-liste A de l'OIE). Cependant, si comme nous l'avons souligné, les taux de morbidité et de mortalité induits peuvent avoisiner les 100% chez les porcs domestiques (Zsak *et al.*, 2005), la maladie peut se manifester selon différents modes, allant de la fièvre hémorragique létale à des formes chroniques voire asymptomatiques en fonction de la virulence de la souche virale.

Par exemple, à Madagascar, l'historique de l'apparition et de l'implantation de la PPA est bien connu. La maladie a été introduite en 1997 à partir de la côte est-africaine (Gonzague *et al.*, 2001), vraisemblablement en provenance du Mozambique. Après un premier foyer apparu mi-1997 dans la région de Taolagnaro (Fort-Dauphin) au sud-est du pays, la maladie s'est propagée très rapidement à d'autres régions, notamment les Hautes Terres du centre de l'île, pour s'étendre enfin à l'ensemble du pays. Le diagnostic de la

maladie a été confirmé en décembre 1998 suite à des analyses virologiques (immunocapture d'antigènes et PCR) effectuées au laboratoire CNEVA (Maison-Alfort, France) à partir de prélèvements de rates et de ganglions lymphatiques de porc (Roger, communication personnelle, 1999). L'analyse phylogénétique de la souche virale l'a classée au sein du génotype II, qui regroupe des isolats de la côte sud-est de l'Afrique, principalement du Mozambique (Bastos *et al.*, 2003), corroborant ainsi l'origine probable de la maladie. Suite à son introduction, la maladie a entraîné une réduction de 60% du cheptel porcin malgache (Gonzague *et al.*, 2001) de par la haute virulence de la souche virale qui induit jusqu'à 90% de mortalité (Rousset *et al.*, 2001). Bien que les causes de l'endémisation ne soient pas totalement élucidées (faible présence du vecteur tique et aucun porc sauvage, potamochère, détecté positif jusqu'ici), la propagation et le maintien de la maladie sont très certainement la conséquence des trop faibles moyens mis en œuvre pour obtenir un diagnostic rapide et donc appliquer des mesures de contrôle véritablement efficaces. Ainsi, la PPA à Madagascar se caractérise aujourd'hui par l'émergence ou la réémergence sporadique mais régulière du virus dans les élevages. Cependant, un taux de mortalité plus faible à l'intérieur des foyers les plus récents a été observé (Costard, données non publiées), dû à une modération possible de la virulence de la souche suite à ses nombreux passages au sein des populations de porc domestique. L'apparition des souches virales de moindre virulence permet le développement des formes chroniques de la maladie (Leitao *et al.*, 2001; Boinas *et al.*, 2004; Sanchez-Vizcaíno, 2006), ce qui ajoute encore à la difficulté de son éradication. En effet, les formes chroniques voire inapparentes de la maladie chez les porcs domestiques jouent un rôle majeur dans son maintien et sa propagation dans les zones endémiques car les porcs porteurs peuvent transporter et transmettre le virus pendant de longue période (Leitao *et al.*, 2001; Villeda *et al.*, 1993; Wilkinson, 1984; Wilkinson *et al.*, 1981).

De plus, le virus est très résistant tant dans les liquides biologiques que dans l'environnement. Il peut ainsi persister plusieurs mois dans les viandes (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2012), les organes (Costard *et al.*, 2009), les fèces (Hass *et al.*, 1995 ; Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2009), et sur du matériel souillé. Cette caractéristique rend de fait l'utilisation, le plus souvent illégale, des eaux grasses dans le nourrissage des porcs domestiques particulièrement problématique.

De nombreux facteurs contribuent donc à maintenir un risque élevé de transmission aux élevages. En cas d'épizootie, les seuls moyens disponibles pour combattre l'installation et la dissémination du virus sont l'abattage systématique et obligatoire de tous

les animaux sensibles (animaux malades et animaux en contact avec eux), la décontamination des élevages, et le strict respect de la quarantaine. Des mesures aussi drastiques doivent normalement faire l'objet de compensation financière pour les exploitants. Cependant, dans la majorité des pays africains, ces indemnisations ne sont pas à la hauteur des pertes directes subies ou dans les secteurs d'activité liés à la transformation des produits carnés d'origine porcine.

2. Impact économique

Du fait d'un cycle de production court et du faible niveau d'investissement qu'il nécessite pour sa mise en œuvre hormis l'achat préalable des animaux, l'élevage de porc se développe rapidement dans les pays économiquement faibles, offrant une ressource bon marché de protéines animales aux populations. L'émergence, le maintien et les réapparitions sporadiques de nouveaux foyers de PPA mettent néanmoins en péril ces exploitations et donc l'approvisionnement en nourriture carnée des populations qui en dépendent.

En Afrique de l'Ouest, par exemple, les foyers apparus au Cameroun en 1982 faisaient suite à une période d'expansion de la filière porcine dans le pays, avec un quasi doublement du nombre d'animaux (FAOSTAT, 2011). Nana-Nukechap et Gibbs (1985) ont estimé les pertes consécutives à l'introduction de la maladie à environ 693000 porcs, soit 63% des 1,1 million de têtes que comptait la population porcine entre 1982 et 1983, pour un coût total de 4,5 millions de dollars US. En Côte d'Ivoire, 135000 porcs sont morts de la maladie ou ont été abattus à Abidjan lors de la période épizootique de 1996 (el Hicheri *et al.*, 1998), soit 29% de la population porcine totale du pays et une perte financière estimée à 9,2 millions de dollars US (Agricultural Research Council, South Africa, 1998). Au Bénin, des foyers de PPA entre 1997 et 1998 ont induit la perte de 6 millions de dollars US pour l'industrie porcine (Basckin, 1998), et les épizooties de 1998 et 2001 au Nigéria ont coûté respectivement 8,4 millions de dollars US dans la seule ville de Lagos et près d'un million en Ibadan, avec une perte de plus de 300000 porcs pour cette dernière (Babalobi *et al.*, 2007). Enfin, au Togo en 1999, 17000 porcs sont morts de PPA et 2500 sont abattus par les services vétérinaires sur une population estimée de 400000 porcs domestiques. La valeur marchande d'un animal étant de l'ordre de 48 dollars US, les presque 1 million de dollars de perte financière ont eu un impact majeur pour les quelques 1500 petits éleveurs concernés (Sorin, 2002).

En Afrique de l'Est, la situation endémique est encore plus dévastatrice. Par exemple, après la réémergence de la maladie de 1989, la Zambie a accusé des pertes de 1,5 milliard de dollars US (Samui *et al.*, 1996), tandis qu'au Malawi entre 1989 à 1990, 31000 animaux, soit 45% des 70000 porcs du cheptel sont morts de la maladie ou ont été abattus pour endiguer sa progression (Edenlsten et Chinombo, 1995).

La maladie fait également des ravages en dehors du continent africain. Que ce soit à Malte ou en République Dominicaine où la population de porc a été éradiquée suite à l'entrée du virus dans les îles, à Cuba où 400000 porcs ont été abattus (Plowright *et al.*, 1994). En Espagne, les 5 dernières années de lutte pour éradiquer la maladie ont coûté quelques 92 millions de dollars US (Arias et Sanchez-Vizcaino, 2002) et en Russie où la perte engendrée par la PPA de 2010 à 2012 est estimée à 1 milliard de dollars US (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2012). Au final, les populations des pays atteints par le virus PPA ont payé un coût élevé, tant économique (perte de leur travail et donc de leurs revenus pour les éleveurs conduisant parfois à la déscolarisation des enfants, comme au Bénin en 1997) que socio-culturel (utilisation proscrite de viande de porc lors des cérémonies). La lutte contre la PPA coûte donc très chère et son éradication peut prendre plusieurs décennies en cas de passage du virus dans la faune sauvage, comme ce fut le cas en Europe dans la péninsule ibérique. Dans les pays où l'infection est endémique, la maladie reste une menace permanente pour les élevages et, avec l'apparition des formes subaiguës et/ou chroniques, la progressive raréfaction des porcs au fil des foyers entraîne une forte augmentation des prix que ne peuvent supporter les populations concernées (Roger *et al.*, 1999).

En conséquence, la peste porcine africaine est sans doute l'obstacle le plus important au développement de la production porcine, non seulement en raison d'une mortalité immédiate élevée, mais aussi par le découragement des investisseurs de la filière suite à sa réémergence (Fouéré, 2007).

3. Signes cliniques et lésions

Même si Montgomery l'a décrite comme une maladie subaiguë du porc domestique, d'autres formes de la maladie ont été observées : aiguë, suraiguë et chronique, qui induisent des signes cliniques variables en fonction de la virulence de la souche et de la durée de l'infection. La race de l'animal, tout comme son état physiologique (âge,

gestation) ont également une influence sur la sensibilité à l'infection. Des études menées au Malawi et en Angola ont ainsi démontré que les races Large White et Landrace étaient plus sensibles que les races locales (Haresnape *et al.*, 1988; Cowan, 1961).

La forme suraiguë se caractérise par une période d'incubation très courte de 48 à 72h, suivie d'une très forte hyperthermie (41 à 42°C) entraînant une mortalité fulgurante des animaux avoisinant les 100% en 1 à 3 jours. Dans les autres formes de la maladie, la durée d'incubation varie de 5 à 15 jours. La forme aiguë est caractérisée par une hyperthermie de 40,5 à 42°C, une forte dépression entraînant une prostration et de l'anorexie associées à des difficultés respiratoires (augmentation du rythme), l'apparition d'érythème épidermique hémorragique, une cyanose (Figures 2 et 3), une congestion des muqueuses et une leucopénie. Des troubles de la locomotion, des vomissements, de la diarrhée alternée avec de la constipation et des avortements chez les femelles gestantes ont été observés. La mort de l'animal survient dans les 2 à 7 jours suivant l'apparition des premiers signes cliniques, et le taux de mortalité peut atteindre là aussi les 100%. Dans la forme subaiguë, l'hyperthermie est moins élevée que dans les formes suraiguës et aiguës. Néanmoins, des avortements chez les femelles gestantes et des plaques d'érythème au niveau des extrémités et des parties déclives de l'animal qui évoluent généralement en nécroses ont été notés. La mortalité varie de 30 à 70%, et survient un peu plus tardivement, dans les 15 à 45 jours. La forme chronique enfin, se caractérise par une atténuation des signes cliniques induits par les autres formes de la maladie : la fièvre est récurrente, moins élevée. Quelques difficultés respiratoires, de l'arthrite, un poil piqué et terne ont été observés. L'évolution de la maladie est plus lente. La mortalité induite est inférieure à 30% et peut survenir dans les 2 à 5 mois (Penrith *et al.*, 2004 ; Crucière, 2003).

L'autopsie des animaux morts de la forme suraiguë de la maladie a montré des lésions très importantes au niveau de la rate (Figure 5), hypertrophiée, friable, et de couleur rouge foncée à noire car gorgée de sang, et des nœuds lymphatiques (Figure 6), également hypertrophiés et hémorragiques (Figure 5). Dans les formes aiguës et subaiguës, des pétéchies et des ecchymoses au niveau du foie, de l'estomac et des viscères sont présentes (Figure 7), au niveau de la vessie, du muscle cardiaque et des reins (Figure 4). Enfin, les formes chroniques se caractérisent quant à elles par des plages de nécroses épidermiques, une péricardite fibreuse, une lymphadénopathie généralisée et une inflammation arthritique des articulations. Les lobules pulmonaires peuvent également être pris en masse, avec ou sans adhésion, c'est la « consolidation » des lobules pulmonaires (Crucière *et al.*, 2003).



Figure 2 : Oreille cyanosée



Figure 3 : Ventre cyanosé



Figure 4 : Pétéchie au niveau du rein



Figure 5 : Rate hypertrophiée



Figure 6 : Ganglion hémorragique



Figure 7 : Hémorragie de l'intestin

Figure 8 : Lésions évocatrices de la peste porcine africaine

4. Pathogénie

Dans la plupart des cas, le virus PPA infecte le porc domestique par voie oro-nasale, lors de contacts étroits avec d'autres porcs infectés, par ingestion de nourriture contaminée ou par contact avec du matériel souillé. Plus rarement, le virus pénètre par morsure du vecteur tique lors de son repas de sang. Sitôt dans l'organisme, le virus commence à se répliquer, d'abord dans les macrophages sanguins pour lesquels il possède un tropisme particulier. Une virémie primaire, asymptomatique, a lieu dans les 8 heures suivant l'entrée du virus (Blome *et al.*, 2012 ; Karalyan *et al.*, 2012), suivie dans les 48h d'une infection

systemique qui précède de 24 à 48h l'apparition des symptômes (Karalyan *et al.*, 2012). Le virus se dissémine dans l'organisme via le sang circulant par le biais des macrophages ou des érythrocytes auxquels les virus qui expriment un ligand au CD2 porcine peuvent se lier (Dixon *et al.*, 2004). Le virus a été retrouvé dans les amygdales puis dans les ganglions lymphatiques de l'appareil respiratoire et digestif. Après une trentaine d'heures, le virus envahit les organes internes (poumon, foie, rate, reins et cerveau) et s'y réplique (Colgrove *et al.*, 1969). L'ensemble des chaînes ganglionnaires est aussi atteint, avec du virus présent dans les ganglions lymphatiques gastrohépatiques, mésentériques, inguinaux, sous-maxillaires et rénaux. Une virémie secondaire apparaît dans les 15 à 24 heures suivant l'infection (Colgrove *et al.*, 1969), à l'origine d'une hyperthermie importante et s'accompagnant d'une phase d'excrétion pouvant aller jusqu'à deux semaines selon les formes de la maladie (Crucière *et al.*, 2003). Au cours de la phase aiguë, jusqu'à 90% des érythrocytes peuvent porter du virus (Penrith *et al.*, 2004 ; Crucière, 2003). Par ailleurs, une lymphopénie a été constatée suite à une destruction importante des lymphocytes T et B, sans pour autant que le virus se réplique dans ces cellules (Ramiro-Ibanez *et al.*, 1997). La destruction massive de ces cellules, tout comme celle des monocytes, est en effet due à leur entrée en apoptose induite par la libération de cytokines, principalement le TNF- α (Tumor necrosis factor- α), par les macrophages infectés (Salguero *et al.*, 2005).

La fièvre hémorragique causée par le virus de la peste porcine africaine est essentiellement due à l'effet du virus sur plusieurs mécanismes de l'hémostase : la destruction massive des monocytes-macrophages dans les stades précoces de l'infection libère des cytokines et des acides arachidoniques (Penrith *et al.*, 2004) qui perturbent l'hémostase. De plus, l'attachement du virus sur les érythrocytes et les plaquettes sanguines entraîne une thrombose généralisée (Plowright *et al.*, 1994). Dans les formes aiguës, une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins a été observée (Penrith *et al.*, 2004 ; Crucière *et al.*, 2003). Durant les phases symptomatiques des formes suraiguës et aiguës, le virus est excrété en continu dans l'ensemble des fluides biologiques alors que dans les formes subaiguës et chroniques, il peut être excrété de manière intermittente et pendant plus de 8 semaines (Ekue *et al.*, 1989; McVicar, 1984 ;de Carvalho Ferreira *et al.*, 2012). Enfin, la mort de l'animal fait suite à un choc hémostatique et/ou une exsudation massive de fluides au niveau du poumon (Villeda *et al.*, 1993a ; Villeda *et al.*, 1993b).

II. Etiologie de la maladie

1. Classification

La PPA est due à un virus à ADN double brin de symétrie icosaédrique, le virus ASFV (pour « African swine fever virus ») (Carrascosa *et al.*, 1984). Son organisation génomique est très similaire à celle des poxvirus, avec un génome dont les extrémités se terminent par des structures en épingle à cheveux (De la Vega *et al.*, 1994). Il a été initialement classé parmi les *Iridovirus*. Depuis, en raison d'une structure et d'une information génétique qui lui sont propres, une nouvelle famille, les *Asfarviridae* dans laquelle il est l'unique membre dans le genre *Asfivirus*, a été créée par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV), (Dixon *et al.*, 2005). Avec les *Poxviridae*, les *Iridoviridae*, les *Phycodnaviridae*, les *Mimiviridae*, les *Ascoviridae* et les *Marseillevirus*, il forme la famille des NCLDV (« NucleoCytoplasmic Large DNA Viruses ») dont l'une des particularités est de se répliquer dans le cytoplasme des cellules qu'ils infectent. Des études phylogénétiques ont d'ailleurs mis en exergue la forte probabilité d'un ancêtre commun à tous les virus de cette famille (Iyer *et al.*, 2006 ; Koonin and Yutin, 2010) (Figure 9). Le virus PPA est le seul virus à ADN à être également classé parmi les arbovirus (arbovirus pour « arthropod born virus ») (Wardley *et al.*, 1983), puisqu'il infecte les vertébrés et les tiques molles du genre *Ornithodoros* (Plowright *et al.*, 1974). Il est à noter qu'il existe d'autres familles de virus à ADN transmis par des arthropodes, telles que les *Geminiviridae* ou les *Nanoviridae*, mais ils n'infectent que les plantes.

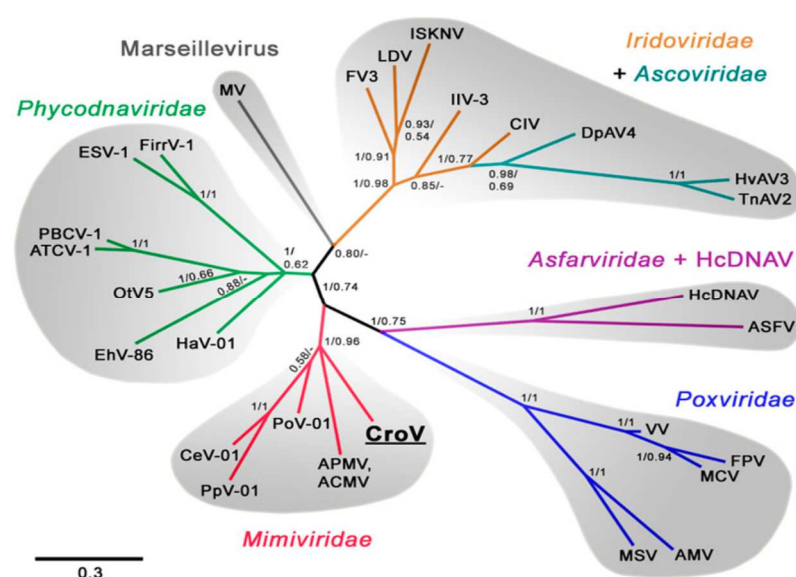


Figure 9: Reconstruction phylogénétique regroupant les familles des grands virus à ADN nucléocytoplasmique (Fischer *et al.*, 2010)

2. Morphologie et structure du virus

La particule virale d'environ 200 nm de diamètre est formée de plusieurs structures concentriques renfermant le génome. En microscopie électronique, 5 couches de densités différentes : une enveloppe externe, une capsid, une enveloppe interne, une matrice (couche lipidique), et un cœur ont été observés (Tulman *et al.*, 2009) (Figure 10). Le cœur est une structure dense de 70 à 100 nm de diamètre contenant le génome viral logé au sein d'un nucléoïde de 30 nm (Carrascosa *et al.*, 1984) et enchâssé dans une couche protéique qui forme la capsid, elle-même composée de 1892 à 2172 capsomères ressemblant à des prismes hexagonaux et qui assurent sa forme icosaédrique (Carrascosa *et al.*, 1984). L'enveloppe externe, quant à elle, est acquise lors du bourgeonnement des virions à travers la membrane plasmique cellulaire (Carascosa *et al.*, 1984 ; Rouiller *et al.*, 1998).

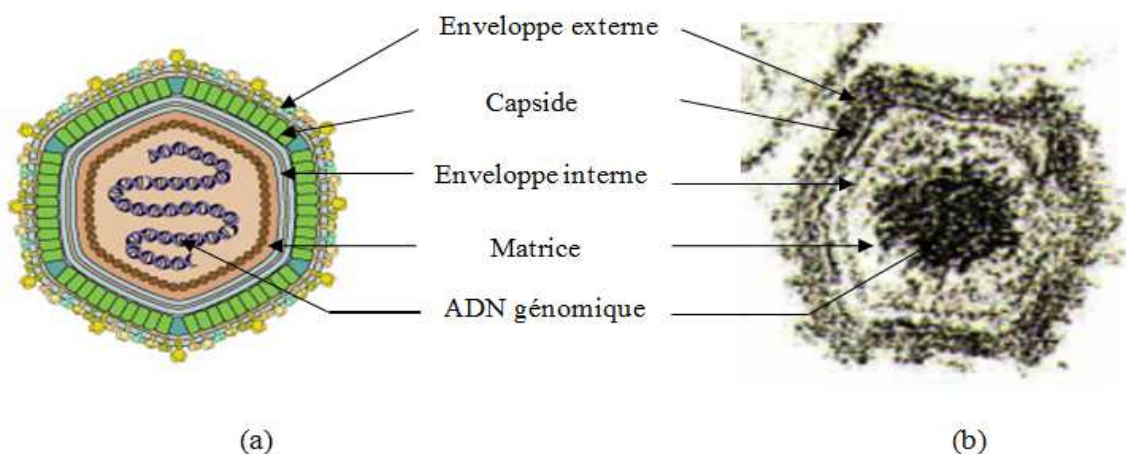


Figure 10 : Virus de la peste porcine africaine : (a) Structure schématisée d'un *Asfivirus*; (b) vue au microscope électronique avec coloration négative (© Swiss Institute of bioinformatics).

Des analyses biochimiques ont dénombré 54 protéines de structure pour la souche Ba71V, une souche adaptée à la culture sur cellules Vero (Dixon *et al.*, 1994 ; Yanez *et al.*, 1995). Parmi elles, des protéines enchâssées dans la membrane externe des virions ont été trouvées. Il s'agit des protéines p54, p24 (d'origine cellulaire) et p12, impliquées dans l'attachement du virus à la membrane des cellules hôtes (Angulo *et al.*, 1993). La p30 (codée par le gène CP204L) est impliquée quant à elle dans l'internalisation du virus. L'enveloppe externe contient également une glycoprotéine très importante pour la virulence du virus, le CD2v (codée par le gène EP402R) (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996).

Cette protéine est impliquée dans la propriété hémadsorbante du virus, c'est-à-dire dans sa capacité à adhérer aux érythrocytes de porc, favorisant ainsi sa dispersion dans l'organisme. Cette propriété hémadsorbante entre dans les critères de distinction des différents isolats du virus de la PPA ainsi que dans leur classification. Enfin, la protéine p22 (une protéine précoce codée par le gène KP177R) est aussi localisée dans cette enveloppe (Camacho and Vinuela, 1991).

D'autres protéines ont été localisées à l'intérieur même du cœur des virions, telles que les protéines p150, p37, p34 et p17, issues du clivage de la polyprotéine pp220, et des protéines p15 et p35 résultant du clivage de la polyprotéine pp62. Enfin, la protéine capsidiale majeure VP72 (codée par le gène B646L) est assemblée au niveau de la membrane interne et localisée à la surface des virions intracellulaires non enveloppés (Cobbol and Wileman, 1998).

En plus des protéines de structure, le virion dispose des enzymes nécessaires à l'initiation de la transcription et de la réplication de son génome, telle qu'une ARN-polymérase-ADN-dépendante dont les ARN qu'elle synthétise seront polyadénylés, méthylés et coiffés par des enzymes également présentes dans le virions (Yanez *et al.*, 1993). des enzymes de modification de l'ADN, telle qu'une protéine kinase, deux nucléosides triphosphates phosphohydrolases, une phosphatase acide et deux désoxyribonucléases ont été également trouvés (Yanez *et al.*, 1995).

A ce jour cependant, toutes les protéines codées par le génome du virus n'ont pas été localisées, ni leur(s) fonction(s) élucidée(s).

3. Organisation du génome et protéines codées

Le génome du virus de la peste porcine africaine est constitué d'une molécule d'ADN double brin linéaire riche en A – T (61% pour la souche BA71v) (Yanez *et al.*, 1995), d'une taille comprise entre 170 et 191 kb selon les isolats étudiés (King *et al.*, 2011), et dont les extrémités sont liées de façon covalente par des structures en épingle à cheveux de 37 nucléotides de long (Gonzalez *et al.*, 1986). Les séquences terminales du génome directement adjacentes à ces structures (déterminées pour la souche Ba71v) sont constituées de séquences inversées et répétées de longueur variable (de 2,1 à 2,5 kb) (Sogo *et al.*, 1984) (Figure 10). La variation en taille des génomes entre isolats s'explique notamment par des réassortiments (insertions ou délétions) de gènes appartenant à 5

familles multigéniques (MGF 360, MGF 110, MGF 300, MGF 530 (ou 505) et MGF 100), situées dans les parties 3' et 5'-terminales du génome viral (De la Vega *et al.*, 1990 ; Yozawa *et al.*, 1994). De plus, le génome du virus possède une région centrale hypervariable d'environ 400 pb (Sumption *et al.*, 1990) située au centre d'une région hautement conservée de 125 kb. Cette région correspond au gène B602L, dont la protéine codée (J9L) est composée de répétitions de tétramères d'acides aminés qui varient en nombres et en types. Ainsi 23 tétramères d'acides aminés différents ont été identifiés, dont les plus courants sont les tétramères CA(D/N)T et NV(D/N)T (Nix *et al.*, 2006). Enfin, Chapman *et al.* en 2008 ont montré que certains gènes pouvaient être dupliqués au sein du génome, comme par exemple le gène KP177R que l'on retrouve sur les deux brins d'ADN du génome de la souche Ben97/1 isolée au Bénin en 1997.

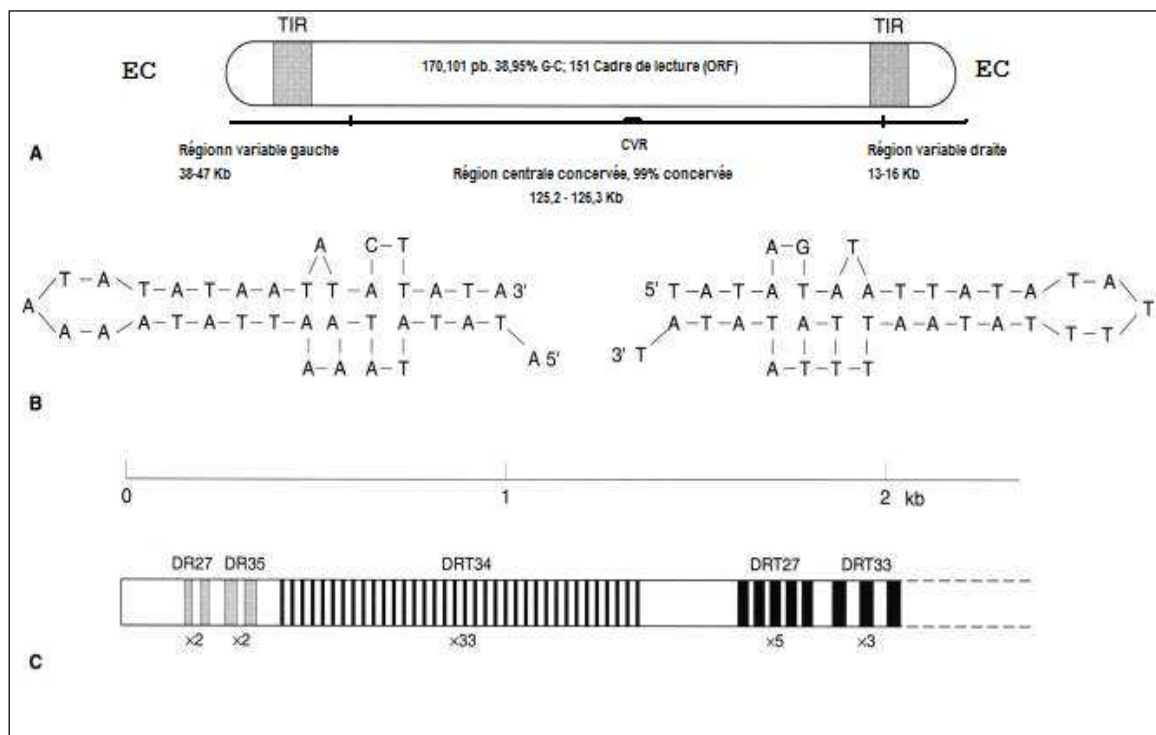


Figure 11 : Structure du génome viral du virus PPA. (A) ADN viral de la souche BA71V dont les séquences terminales inversées et répétées (TIR) se terminent par des structures en épingle à cheveux (EC). (B) Détail des épingles à cheveux composées de structure secondaire de 37 nucléotides. (C) Structure des extrémités inversées et répétées. (Maria L Salas, 1999)

L'analyse de dix génomes complets du virus PPA a montré que le virus, contenait 151 à 167 cadres de lecture (ORFs) selon les souches, repartis sur les deux brins de l'ADN (Yanez *et al.*, 1995 ; Chapman *et al.*, 2008 ; de Villiers *et al.*, 2010), et donc autant de

protéines potentiellement codées. Chaque gène est précédé d'une région non codante (trailer) et d'un promoteur pouvant être précoce, intermédiaire ou tardif, ceci laissant à penser que l'expression des gènes viraux est soumise à une régulation en cascade (Almazan *et al.*, 1992 ; Almazan *et al.*, 1993 ; Rodriguez *et al.*, 1996b).

La fonction des gènes appartenant aux familles multigéniques localisées aux deux extrémités et constituant de 17 à 25 % du génome total reste encore mal élucidée. Cependant, certains d'entre eux sont connus pour leur impact sur le spectre d'hôtes, c'est-à-dire sur la capacité du virus à se répliquer dans des hôtes différents. Il s'agit des gènes 3HL, 3IL et 3LL, appartenant à la MGF 360 et impliqués dans la réplication chez le vecteur tique (Burrage *et al.*, 2004), ainsi que des gènes appartenant aux MGF 360 (2AL, 2BL, 3BL, 3CL, 3DL, 3EL, 3HL et 3IL) et 530 (3FR et 3NR), impliqués quant à eux dans la réplication à la fois chez le porc et chez la tique (Zsak *et al.*, 2001). La réplication cytoplasmique du virus lui impose de coder pour bon nombre d'enzymes et de facteurs nécessaires à sa réplication et à la transcription de ses gènes. Ainsi, en plus des 15 gènes codant pour des protéines structurales qui ont été identifiés dans son génome (Dixon *et al.*, 2004), le virus code également pour les enzymes enchâssées dans son cœur (Dixon *et al.*, 2004) et qui seront utilisées très tôt après le début de l'infection (cf II-5-1). D'autres protéines seraient engagées dans la survie et la transmission du virus. Notons la protéine précoce codée par le gène A238L qui inhibe l'activation du NFκB (nuclear factor-kappa B) ou la protéine CD2V (responsable de l'hémadsorption), toutes deux impliquées dans l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte.

4. Entrée du virus dans la cellule cible

Avant de pénétrer dans la cellule, le virus doit préalablement se fixer à la membrane cellulaire. La fixation du virus est médiée par au moins deux récepteurs cellulaires, les cellules permissives au virus exprimant à la surface de leur membrane les protéines SWC9 et CD163 (McCullough *et al.*, 1999 ; Sanchez-Torres *et al.*, 2003). Concernant le virus, une seule protéine d'attachement a été jusqu'ici identifiée, la protéine p12, synthétisée tardivement lors du cycle réplcatif viral et montrant un haut degré de conservation entre les isolats (Alcami, 1992 ; Angula, 1993).

Après sa fixation, le virus pénètre dans les cellules par endocytose en utilisant les endosomes pour rejoindre ensuite les lysosomes, dont le pH acide permettra de désencapsider le génome viral (Valdeira, 1985 ; Valdeira *et al.*, 1998).

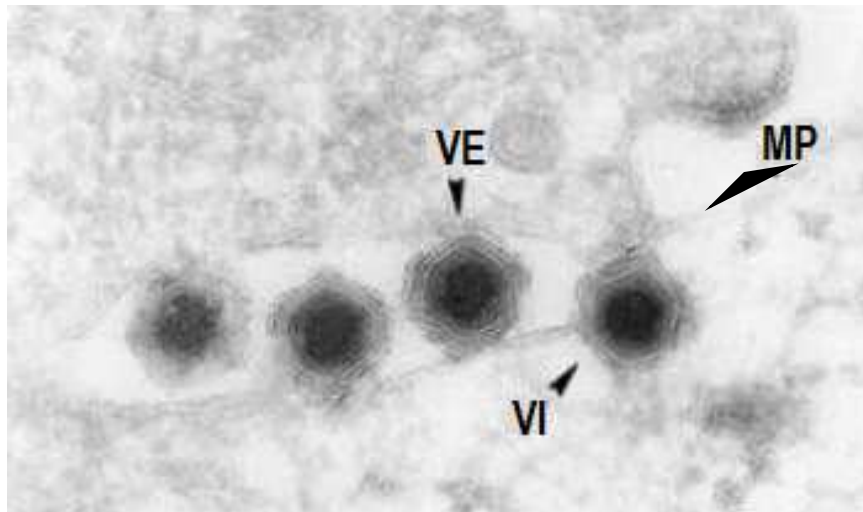


Figure 12 : Attachement du virus PPA sur les cellules vu au microscope électronique avec coloration négative. (VE) particule virale extra - cellulaire, (VI) particule virale intracellulaire, (MP) membrane plasmique (Maria L Salas, 1999).

Outre la protéine d'attachement p12, 3 autres protéines virales sont connues pour avoir un rôle important dans l'internalisation du virus dans la cellule, il s'agit des protéines p30, p54 et p72. En effet, le blocage de ces protéines par des anticorps inhibe l'entrée et l'internalisation du virus (Borca *et al.*, 1994a ; Gomez-Puertas et Escribano, 1997 ; Gomez-Puertas *et al.*, 1998 ; Gomez-Puertas *et al.*, 1996 ; Dixon *et al.*, 2004). Cependant, tous les mécanismes d'entrée du virus restent à ce jour encore mal élucidés.

5. Réplication du virus

La réplication du virus PPA a entièrement lieu dans le cytoplasme des cellules infectées (Breese and DeBoer, 1966), même si des échanges semblent exister avec le noyau de la cellule (Garcia-Beato *et al.*, 1992). Elle a lieu préférentiellement dans des cellules primaires de porc, le virus ayant un tropisme particulier pour les monocytes et les macrophages. Selon le stade de l'infection, le virus sera également retrouvé dans d'autres types cellulaires : cellules nucléées du sang circulant (mégacaryocytes, neutrophiles et

thrombocytes) (Carrasco, 1992), cellules endothéliales et dendritiques (Vallée, 2001) ou encore hépatocytes (Fernandez, 1992).

La réplication du virus se déroule en plusieurs étapes (Figure 13). Suivant l'entrée du virus dans la cellule cible, l'ADN viral est libéré et les gènes précoces sont exprimés, permettant l'initiation de la réplication du génome. Les protéines de structure sont ensuite synthétisées pour permettre l'assemblage du virion. Enfin, le cycle réplcatif du virus se termine par la libération des particules virales néoformées au travers de la membrane plasmique cellulaire ou suite à la mort de la cellule.

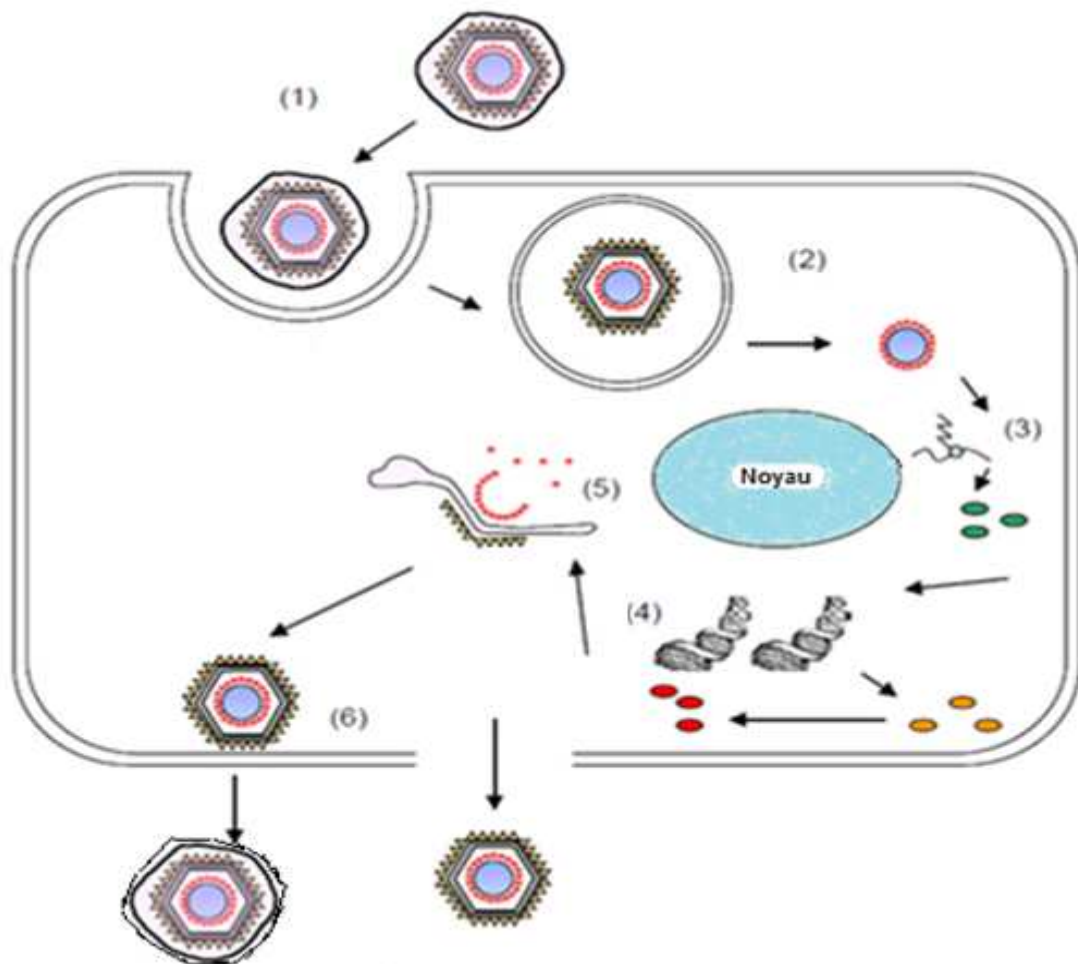


Figure 13 : Cycle de la réplication virale. 1 : pénétration par endocytose, 2 : désencapsidation de l'ADN et libération des enzymes virales permettant l'expression des gènes précoces, 3 : réplication du génome au niveau de sites périnucléaires (« usines à virus »), 4 : expression des gènes tardifs, 5 : Assemblage des virions, 6 : bourgeonnement à la membrane cellulaire des virions néoformés ou libération par lyse cellulaire. (Gavin Bowick, Institute for Animal Health)

5.1. Transcription et traduction des gènes

La transcription des gènes très précoces, vraisemblablement grâce à des facteurs de l'initiation de la transcription présents dans le virion (Salas, 1999), est nécessaire à l'initiation de la réplication du génome viral et commence dès l'entrée du virus dans le cytoplasme cellulaire. Cette transcription précoce est rendue possible par l'utilisation de l'ARN-polymérase-ADN-dépendante présente dans le virus (Yanez, 1993). Parmi ces facteurs de transcription, certains sont homologues à ceux déjà identifiés chez les *Poxvirus* : il s'agit des protéines A2L (codée par le gène B385R chez le virus PPA), A7L (gène G1340L) et VLTF2 (gène B175L), nécessaires à la reconnaissance par la cellule hôte des promoteurs viraux (Salas *et al.*, 1999 ; Iyer *et al.*, 2006). Les modifications post-transcriptionnelles des ARNm (polyadénylation et coiffe) sont ensuite assurées par des enzymes présentes dans le cœur du virion (Kuznar *et al.*, 1980 ; Pena *et al.*, 1993 ; Salas *et al.*, 1999). Il est à noter que la séquence des promoteurs de ces gènes très précoces est courte (40 à 50 pb), très proche de l'origine de réplication du gène et très riche en A-T (Rodriguez *et al.*, 2012). De plus, ces gènes de transcription précoce se terminent par un signal de fin de traduction de 7 bases T au lieu des 10 habituelles, suggérant l'existence d'ARNm polycistroniques, existence confirmée par l'observation de polyprotéines virales (Almazan *et al.*, 1992; Almazan *et al.*, 1993; Goatley *et al.*; 2002). Des gènes précoces et intermédiaires sont également transcrits mais restent silencieux et ne seront utilisés que durant les dernières phases de la réplication du virus.

L'ADN polymérase virale codée par le gène G1207R (homologue aux α -like ADN polymérases) (Rodriguez *et al.*, 1993) est indispensable à la synthèse de l'ADN viral, tout comme trois autres enzymes, une thymidine kinase (Martin Hernandez and Tabares, 1990), une ribonucléotide réductase (Cunha and Costa, 1992) et une ADN ligase (Yanez and Viñuela, 1993). Enfin, le virus code pour des enzymes de maturation et de réparation de l'ADN telle qu'une endonucléase apurinique / apyrimidique, et une polymérase du type β -pol (Oliveros *et al.*, 1997).

La traduction des protéines intermédiaires et tardives, principalement des protéines structurales, est initiée elle aussi par des promoteurs de courtes séquences et riches en A-T (Rodriguez *et al.*, 2012) et est dépendante de l'avancement de la réplication de l'ADN (Dixon *et al.*, 2012).

5.2. Morphogénèse

L'assemblage du virion, tout comme la réplication du génome, a lieu dans le cytoplasme de la cellule (Andrés *et al.*, 1997 ; Brookes *et al.*, 1996), précisément dans des sites discrets périnucléaires appelés « usines à virus ». Ces usines sont adjacentes à l'appareil de Golgi et au réseau de microtubules et sont entourées de citernes de réticulum endoplasmique, de mitochondries et par une cage de vimentine (Andrés *et al.*, 1997, Rojo *et al.*, 1998, Heath *et al.* 2001). Au sein de ces sites, de nombreuses structures capsidiales partielles, de une à six faces hexagonales et toutes les formes virales intermédiaires jusqu'au virions néoformés ont été trouvées (Rouillier *et al.*, 1998).

La morphogénèse commence par la formation des précurseurs de la structure de la membrane interne, au cours de laquelle la protéine p54 est recrutée au niveau du réticulum endoplasmique. (Suarez *et al.*, 2010 ; Andres *et al.*, 1998 ; Rodriguez *et al.*, 2004). Les liaisons de la p54 avec des fragments de citerne du réticulum endoplasmique et avec la chaîne légère de dynéine LC8 permettent alors la translocation de ces structures membranaires via le réseau de microtubules jusqu'au site d'assemblage (Alonso *et al.*, 2001 ; Heath *et al.*, 2001).

Dans une seconde étape, ces précurseurs prennent une forme icosaédrique en intégrant progressivement la protéine capsidiale VP72 au niveau de leur face externe. La fonction essentielle de la protéine codée par le gène B438L dans la structuration icosaédrique de la capside virale a été notée (Epifano *et al.*, 2006), l'absence de cette protéine conduit à la formation des particules filamenteuses.

L'étape suivante est dépendante des deux polyprotéines tardives pp220 (gène CP2475L) et pp62 (gène CP530R) qui jouent un rôle crucial dans l'assemblage du cœur du virus, à savoir la nucléocapside (Suarez *et al.*, 2010 ; Alejo *et al.*, 2003). En effet, leur clivage, réalisé par la protéase virale codée par le gène S273R au niveau d'un site spécifique Glycine-Glycine-X, permet d'obtenir 6 protéines structurales qui constituent 30% du cœur des virions. Ainsi, la polyprotéine pp220, liée de façon covalente à un acide myristique, donne naissance à 4 protéines (p150, p37, p34 et p14) et la polyprotéine pp62 à deux protéines (p35 et p15) (Andres *et al.*, 2001). Toutefois, l'intégration dans le cœur du virus des produits de clivage de ces deux polyprotéines reste dépendante de l'expression de la protéine VP72 (Alejo *et al.*, 2003 ; Andres *et al.*, 2002). L'ADN génomique viral

néosynthétisé est alors empaqueté dans cette structure icosaédrique naissante qui se referme aussitôt (Andrés *et al.*, 2002).

La dernière étape de maturation du virion est caractérisée par la condensation du cœur dans la nucléocapside, qui résulte de l'association des protéines B119L (une sulfhydryle oxydase) et A151R avec la protéine structurale pE248R (une protéine tardive myristoylée) par le biais de mécanisme redox (Rodriguez *et al.*, 2006). La protéine pB119L oxyde la protéine pE248R pendant l'assemblage du virus et le motif CXXC contenu dans la protéine pA151R permet la liaison par des ponts disulfures avec la protéine structurale pE248R. Cette protéine contient dans sa partie N-terminale 4 résidus cystéine qui sont un élément essentiel du système redox en permettant la génération de ponts disulfures. Il est donc possible que la sulfhydryle oxydase du virion et la protéine pA151L exercent une fonction catalytique sur la protéine pE248R pendant le processus d'assemblage du virus.

5.3. Libération des virions néoformés

Après leur morphogénèse, les virions matures sont transportés des usines à virus vers la membrane plasmique de la cellule hôte via le réseau de microtubules (Hernaiz *et al.*, 2006), et les particules virales sont libérées par bourgeonnement à la membrane plasmique, acquérant ainsi leur enveloppe externe (Netherton et Wileman., 2013 ; Crucière, 2003). Il est à noter que les virions néoformés libérés directement suite à la mort de la cellule par nécrose ou apoptose ne disposeront pas de cette enveloppe externe, sans que pour autant leur potentiel infectieux ne soit entamé (Dixon, 2006).

6. Epidémiologie

Selon les régions, des situations épidémiologiques différentes ont été observées, à savoir épizootiques ou enzootiques, dues à la multiplicité des hôtes et à la variété des modes de transmission du virus.

Les espèces animales susceptibles d'être infectées par le virus de la peste porcine africaine sont les suidés domestiques et sauvages ainsi que les tiques molles du genre *Ornithodoros*. Chez les suidés sauvages africains, que ce soient chez les phacochères (*Phacochoerus africanus*), les potamochères (*Potamochoerus porcus*) ou les hylochères

(*Hylochoerus meinertzhageni*), l'infection est asymptomatique (Penrith *et al.*, 2004). Les animaux, principalement les phacochères, sont infectés par la piqûre des tiques molles qui infestent leur terrier lors de leur repas de sang. Le passage du virus entre les arthropodes et les suidés constitue le cycle selvatique de la maladie, un cycle très ancien et qui peut être entretenu pendant longtemps. *A contrario*, le virus entraîne une mortalité chez les sangliers européens (*Sus scrofa ferus*) identique à celle observée chez les porcs domestiques qui en descendent (Sanchez-Vizcaino, 2006). Dans ce cas, l'infection des animaux ne nécessite pas la présence du vecteur tique, car tout comme chez les porcs domestiques, les sangliers peuvent se contaminer par contact. Le passage direct du virus entre les animaux constitue le cycle domestique de la maladie.

Lorsque la PPA entre dans un pays, sa propagation se fait principalement par le biais du cycle domestique, c'est-à-dire par transmission directe entre animaux malades et animaux sains, ou indirecte, par ingestion de nourriture contaminée ou contact avec des vecteurs passifs tels que des véhicules, des objets ou des humains souillés. En Espagne par exemple, des enquêtes épidémiologiques ont permis d'évaluer et de situer les sources premières de contamination : la source la plus importante provenait de contact entre des fermes peu éloignées, (65% des nouveaux foyers), suivie de l'introduction d'animaux porteurs dans une exploitation (19%) et, loin derrière, les contacts avec des suidés sauvages (5,8%) et les tiques (5%) (Mebus, 1988). Bien que les tiques soient importantes dans l'épidémiologie de la PPA, elles ne sont pas la principale cause de propagation de ce virus. L'extension au niveau international de la PPA est surtout due aux déchets alimentaires contenant des produits porcins transformés et donnés comme nourriture aux porcs domestiques (cf supra). Les animaux au stade d'incubation ou infectés par une souche peu virulente ne sont généralement pas détectés à l'abattoir. Que les animaux rescapés et guéris puissent rester porteurs doivent également être pris en considération dans la transmission de la maladie.

En Afrique, les suidés sauvages sont considérés comme les réservoirs de la PPA (De Tray, 1957 ; Saliki *et al.*, 1985 ; Sanchez-Vizcaino, 1998). Même s'ils ne présentent pas de signes cliniques, l'infection induit une virémie, faible, uniquement chez les juvéniles, et une séroconversion s'ensuit. Chez l'adulte, en l'absence de virémie, le virus peut être isolé à partir des ganglions lymphatiques (Kleiboeker *et al.*, 1997 ; Anderson *et al.*, 1998 ; Oura *et al.*, 1998), le virus n'étant pas détectable dans les autres organes (Plowright, 1981).

Au sein d'une colonie de tiques *Ornithodoros*, le virus de la PPA se transmet par voie transovarienne, trans-stadiale et sexuelle, ce qui fait de ces arthropodes un réservoir sans doute plus important que l'hôte mammifère. En effet, à l'intérieur d'une tique, le virus se réplique tout d'abord au niveau de l'épithélium intestinal (Plowright, 1970). Après 15 à 21 jours, l'infection se généralise et le virus gagne les glandes salivaires et les glandes coxales dont les sécrétions sont alors infectieuses. De plus, les tiques peuvent rester sans se nourrir, à l'état quiescent, pendant près de 5 ans, et restent infectieuses pendant une période d'au moins 8 ans (Fernandez Garcia, 1970 ; Oleaga-Perez, 1990 ; Boinas, 1995).

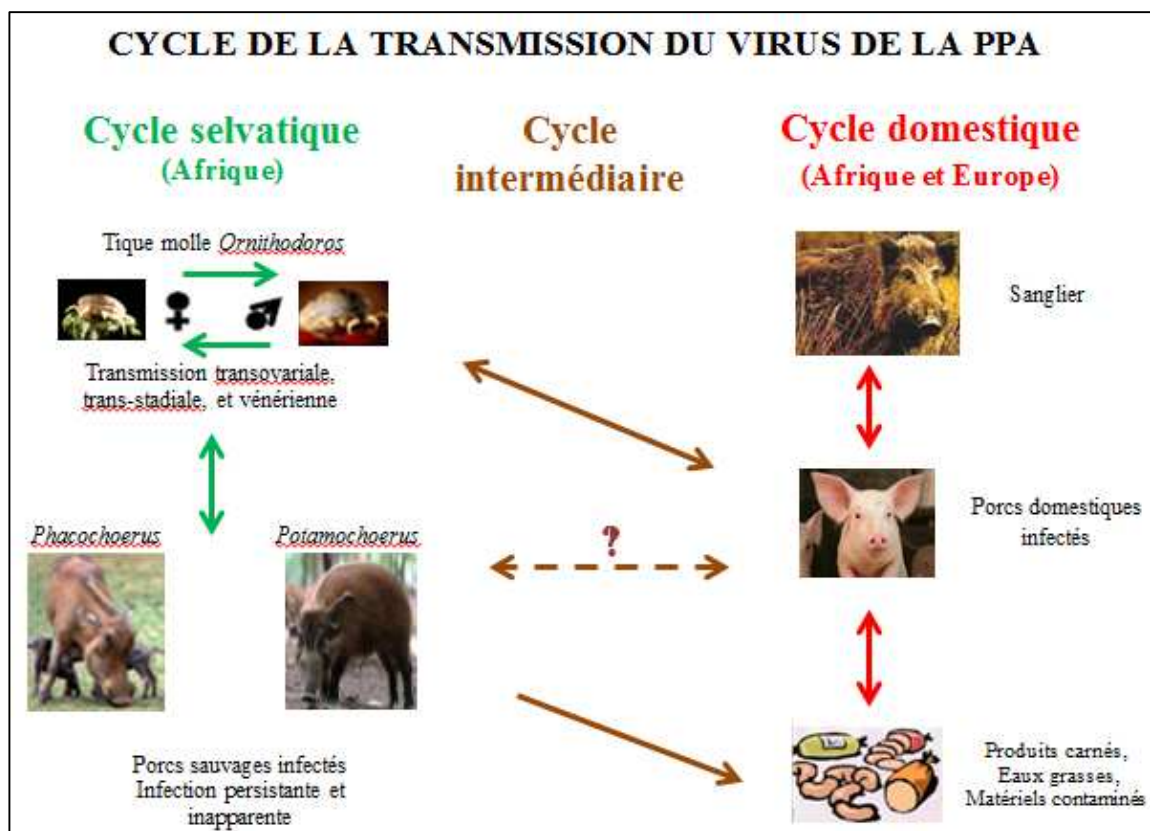


Figure 14 : Cycle de transmission du virus de la PPA chez les différents hôtes (les porcs domestiques, les porcs sauvages et les tiques molles)

Si le cycle selvatique est fondamental dans la persistance de la maladie dans l'est et le sud de l'Afrique, dans les pays ouest-africain en revanche, le rôle des suidés sauvages et des tiques semble être moins important dans son endémisation (Penrith et Vosloo, 2009). Dans ces pays, en effet, la maladie est maintenue et se propage principalement par les mouvements et le commerce non contrôlés d'animaux et de produits dérivés du porc. Ainsi, de la présence des réservoirs sauvages, du vecteur, et de leurs interactions avec les suidés domestiques, cinq scénarios épidémiologiques peuvent découler.

Le premier scénario décrit le mode de transmission le plus ancien, à l'œuvre dans l'est et le sud de l'Afrique. Il implique les réservoirs sauvages et le vecteur puisque dans ces régions, la transmission aux porcs domestiques est souvent due à des piqûres de tiques infectées ou à l'ingestion de viande de phacochère contaminée (Wilkinson, 1986).

Le second scénario décrit la situation dans l'ouest du continent africain. Ici, la transmission se fait essentiellement par contact direct entre les porcs domestiques ou par contact indirect entre les porcs et les produits carnés dérivés du porc. Des facteurs socio-économiques tels que le manque de structure assurant les contrôles vétérinaires ou le manque de compensation financière allouée aux éleveurs dont le cheptel est atteint par le virus expliquent le maintien de la maladie à l'intérieur des pays mais aussi sa propagation vers les pays voisins. Cette situation prévaut à Madagascar, et également pour part dans le Caucase et dans la Fédération de Russie (Beltran-Alcrudo *et al.*, 2009).

Le troisième scénario a été observé suite à l'introduction de la maladie dans la péninsule ibérique en 1957 et implique le vecteur mais pas le réservoir. Dans un premier temps, les porcs domestiques et les sangliers sauvages atteints l'ont principalement été par contacts directs entre animaux et ingestion de produits carnés infectés. Cependant, des études ont montré la compétence de l'espèce de tique molle locale *O. erraticus*, pour le virus PPA, tiques qui, malgré l'absence de transmission verticale et horizontale entre ces arthropodes ont néanmoins contribué à la transmission de la maladie, notamment dans le cadre de sa réémergence au Portugal en 1999 (Boinas *et al.*, 2011). Ce modèle de scénario a également existé dans certaines régions de l'Afrique centrale (démonstré au Malawi) (Haresnape *et al.*, 1988), et probablement au Mozambique et en Zambie (Penrith *et al.*, 2007), où la PPA est maintenue au sein de la population porcine domestique à cause des tiques molles qui infestent les porcheries.

Le quatrième scénario s'est produit lorsque la maladie a été introduite dans d'autres pays d'Europe et en Amérique du sud au cours des années 1970. La maladie n'a touché que les porcs domestiques, sans rôle du vecteur tique dans sa transmission, puisqu'il est absent dans ces régions. L'absence de réservoir sauvage et/ou du vecteur a ainsi facilité l'éradication de la maladie qui a été obtenue après des campagnes d'abattage massif (Lyra, 2006).

Enfin, le dernier scénario relate la situation observée actuellement en Russie et dans les pays transcaucasiens où le cycle de la PPA implique les porcs domestiques et les sangliers, alors qu'aucun rôle dans le maintien ou la transmission n'a jusqu'ici été démontré concernant les espèces de tique autochtone. La majorité des porcs domestiques a

ainsi été contaminée suite à des mouvements d'animaux infectés, et s'est propagée à la faune sauvage par contact entre les suidés sauvages et les porcs domestiques (OIE, 2011 ; EFSA, 2010).

Outre la présence du virus dans la faune sauvage, le mode d'élevage pratiqué a un impact sur le maintien et la transmission de la PPA. En effet, la divagation des porcs, mode d'élevage répandu dans les pays africains et dans l'Europe de l'Est, implique un niveau élevé de contact entre faune sauvage et domestique propice au maintien et à la circulation du virus PPA (Penrith *et al.*, 2004a, b). De plus, le manque de mesures basiques de biosécurité dans les systèmes d'élevage tout comme l'utilisation des déchets de cuisine pour le nourrissage des porcs (Costard *et al.*, 2009a; Missohou *et al.*, 2001) sont des facteurs aggravant des risques d'exposition des animaux au virus. Enfin, la présence de tiques *Ornithodoros* dans les porcheries parachève le risque d'introduction et surtout de maintien de la maladie dans un élevage. Cependant, au-delà des multiples possibilités de contact entre les animaux et le virus, un lien peut être fait entre l'expansion de la filière porcine dans une région et le risque d'infection. Ainsi, en Afrique un lien semble exister entre la taille de la population porcine et la probabilité d'émergence de la maladie (Penrith *et al.*, 2013).

7. Réponse immune et protection chez le porc domestique

Lorsque les porcs survivent à une infection par le virus PPA, ils développent une réponse immunitaire protectrice spécifique de la souche qui les a atteints. Des IgM dans le sérum des animaux dès le 4^{ème} jour post-infection (PI) et des IgG avec des titres élevés à 14 jours PI ont été trouvés, ces derniers perdurant dans l'organisme pendant une longue période (Cubillos *et al.*, 2013) assureront la protection de l'animal contre une nouvelle infection par une souche homologue (Sánchez-Vizcaíno 1999). En revanche, ils ne développent pas de protection contre une infection par une souche hétérologue (Wardley et Wilkinson, 1985, Boinas *et al.*, 2004).

Si l'infection par le virus PPA entraîne donc la production d'anticorps, des études ont montré qu'elle n'entraînait en revanche pas la production d'anticorps sériques neutralisants, que ce soit à la suite d'une infection naturelle ou expérimentale (Gomez-Puertas *et al.*, 1996 ; De Boer *et al.*, 1969 ; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1986). En effet, les anticorps générés contre le virus n'ont que la capacité de retarder l'apparition des symptômes cliniques et de diminuer la virémie (Onisk *et al.*, 1994).

L'étude des mécanismes de neutralisation ainsi que de leurs principaux déterminants antigéniques a montré que des anticorps dirigés contre les protéines VP72 et p54 étaient impliqués tout au début du cycle de réplication du virus, c'est-à-dire lors de la phase d'attachement, tandis que des anticorps reconnaissant la protéine p30 étaient associés à l'inhibition de l'internalisation du virus (Gómez-Puertas *et al.*, 1996). Ainsi, l'immunisation des porcs par un mélange de protéines recombinantes p30 et p54 permet à la fois la neutralisation du virus ainsi qu'une modification de la clinique de la maladie, avec un retard de l'apparition des symptômes (Gómez-Puertas *et al.*, 1998). Néanmoins, des travaux ultérieurs ont suggéré que les anticorps ciblant les protéines VP72, p54 et p30 du virus n'étaient pas suffisants pour permettre une protection efficace (Neilan *et al.*, 2004) car ils ne parviennent pas à neutraliser la totalité des virus. Gomez-Puertas et Escribano, (1997) ont ainsi estimé que 10% des virus ne seraient pas neutralisés par les anticorps, et ont alors émis l'hypothèse d'un phénomène possible de compétition entre les anticorps neutralisant le virus et les anticorps anti-idiotypiques qui les bloquent. Une autre hypothèse repose sur l'origine cellulaire de l'enveloppe externe du virus qui lui permettrait d'échapper à la neutralisation par les anticorps anti-PPA (Mebus, 1988). Ces hypothèses pourraient expliquer l'échec des tentatives de développement d'un vaccin efficace et ce malgré plus de 50 ans de recherche. En revanche, des essais d'immunisation expérimentale de porc avec la souche portugaise non virulente OURT88/3 suivis d'une épreuve infectieuse avec la souche virulente étroitement liée OURT88/1, toutes deux isolées à partir de tiques *O. erraticus* au Portugal, ont conféré une protection contre des isolats africains virulents appartenant au même génotype (King *et al.*, 2011), c'est-à-dire le génotype I. Ces épreuves d'immunisation suggèrent que l'utilisation d'un panel d'isolats atténués par délétion sélective d'un ou plusieurs loci du génome viral pourrait être la meilleure approche pour produire un vaccin efficace contre un ensemble de souches.

Lors d'une infection, la réponse immune de l'hôte ne se limite pas à la génération d'anticorps. Une réponse immunitaire cytotoxique spécifique a également lieu, comme démontré contre un isolat non létal, avec une implication des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (Martins *et al.*, 1993). La production par les lymphocytes T CD8+ d'une grande quantité d'interféron gamma (Alonso *et al.*, 1997 ; Leitaó *et al.*, 1998) permet de bloquer la synthèse des protéines virales en inhibant l'initiation de la traduction. Or, dans les formes aiguës et suraiguës de la maladie, une forte leucopénie due à la réduction massive du

nombre de lymphocytes et de macrophages, associée à une neutrophilie a été observée (Plowright *et al.*, 1994). De manière directe, une lyse massive des macrophages infectés a été constatée, due au bourgeonnement des virus néoformés à la membrane cellulaire et à leur lyse par des lymphocytes T CD8⁺ reconnaissant spécifiquement les protéines virales p32 et VP72.

L'infection induit également une réponse cellulaire non spécifique, la réponse NK. Cette réponse immune a pour objectif de détruire toute cellule anormale dans l'organisme, c'est-à-dire présentant des antigènes du non-soi à leur surface, ce qui est bien entendu le cas des cellules infectées par le virus PPA. Les cellules NK agissent en induisant les cellules anormales en apoptose, puis en lyse. L'augmentation de l'activité NK a été démontrée par l'utilisation d'une souche peu virulente, la souche ASF/NH/P68, d'origine portugaise, dans le cadre des essais vaccinaux contre la souche homologue virulente L60 (Martins and Leita, 1994). Si cette étude a démontré un lien entre le niveau de la réponse NK et la protection, une autre a par la suite démontré que cette activité était à l'origine même de la protection immunitaire (Leita *et al.*, 2001).

8. Echappement au système immunitaire de l'hôte

Le virus PPA comme d'autres virus à ADN (Poxvirus, Adénovirus ou Herpes virus) développe plusieurs mécanismes qui lui permettent d'échapper aux réponses immunitaires cellulaires et humorales de son hôte (Dixon *et al.*, 2004). Parmi les quelques 150 gènes que compte le génome du virus PPA, une soixantaine est estimée non essentielle à la réplication virale. Ils sont en revanche impliqués dans la manipulation et l'échappement à la réponse immune de l'hôte (Yanez *et al.*, 1995).

Parmi les protéines codées par ces gènes, la protéine codée par le gène A238L a été trouvée qui, en immobilisant le facteur de transcription NFκB inhibe l'induction des cytokines pro-inflammatoires indispensables à la réponse immunitaire innée (Powell *et al.*, 1996). Cette protéine a aussi une action pro- et anti-apoptotique selon les étapes de l'infection, puisque la voie NFκB est aussi impliquée dans l'activation de la transcription des gènes anti-apoptotiques (Micheau *et al.*, 2001). Enfin, cette protéine est également capable d'inhiber l'activation du facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells) chez les macrophages, facteur qui contrôle l'activation des lymphocytes et donc la réponse immunitaire acquise.

Dans une cellule, l'apoptose bloque la réplication virale et empêche la dispersion des nouveaux virions à l'intérieur de l'hôte. De nombreux virus ont donc développé des mécanismes pour l'inhiber (Benedict *et al.*, 2002; Hay et Kannourakis, 2002). Ainsi, outre la protéine pA238L, le virus PPA code pour deux autres protéines semblables aux protéines anti-apoptotiques de ses cellules hôtes : la protéine pA224L, qui en se liant avec une caspase-3 inhibe son activité protéasique, et la protéine pA179L, un homologue de la protéine Bcl-2, inhibiteur de l'apoptose des cellules (Neilan *et al.*, 1993; Afonso *et al.*, 1996 ; Revilla *et al.*, 1997).

Une autre façon d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte est de moduler l'expression des gènes dont elle dépend. Ainsi, les protéines codées par les gènes A528R (MGF 530), A276R (MGF 360) ou I329L ont un impact dans la modulation de la réponse interféron de type I (IFN- α et IFN- β) et de type II (IFN- γ) de l'hôte. En effet, les produits des gènes A538R et A276R inhibent directement la transcription de ces gènes codant pour les IFN- α et - β (Afonso *et al.*, 2004) tandis que le produit du gène I329L, en se liant aux récepteurs de type Toll (TLR3), inhibe l'induction d'IFN- β , mais aussi l'activation de la voie NF κ B (de Oliveira *et al.*, 2011). Or, la réponse interféron de type I ou II de l'hôte à un virus est cruciale pour le contrôle de l'infection. En effet, leur sécrétion par des cellules infectées induit une réaction antivirale des cellules adjacentes, permettant la coordination des réponses immunitaires innée et acquise et donc la limitation de la réplication virale. L'inhibition et/ou la modulation de l'induction d'IFN limite donc la réponse de l'hôte tout en accroissant la virulence du virus.

Enfin, la protéine virale j4R, une enzyme codée par le virus et couplée à l'ubiquitine a un rôle dans la régulation d'autres voies de transcription des gènes de l'hôte (Bulimo *et al.*, 2000, Goatley *et al.*, 2002), notamment de ceux qui dépendent de l'interaction des protéines c-Jun et α -NAC. De même, la protéine UBCv codée par le gène I215L se lie à la protéine nucléaire SMCY de l'hôte qui est impliquée dans la régulation de la transcription.

L'importance de la protéine CD2v a été également notée. Elle contient deux domaines Ig-like et dispose d'un peptide signal et d'un domaine transmembranaire. Elle entraîne l'adsorption des globules rouges aux cellules infectées et des particules virales extracellulaires (Rodriguez *et al.*, 1993, Borca *et al.*, 1994). *In vivo*, la délétion de ce gène induit un retard de l'explosion virémique et de la dissémination systémique du virus. Enfin, son expression *in vitro* est nécessaire à la prolifération lymphocytaire (Borca *et al.*, 1998)

9. Persistance et résistance du virus PPA

En plus de sa capacité à se maintenir en échappant au système immunitaire de son hôte, une autre caractéristique du virus PPA est sa capacité à se maintenir dans l'environnement, c'est-à-dire sa résistance et sa persistance (Penrith et Volsow, 2009 ; Plowright *et al.*, 1994), qui induisent un fort risque de réémergence.

En effet, le virus résiste par exemple aux variations de pH se produisant lors de la maturation de la viande, ainsi qu'aux processus de transformation utilisés dans la fabrication des produits carnés à base de porc, tels que la salaison (McKercher *et al.*, 1978). Le virus résiste de même à une large gamme de variation de températures : 3 à 6 mois dans du muscle squelettique ou de la moelle osseuse conservés à +4°C (Kowalenko *et al.*, 1965), plus de 6 mois dans les viandes congelées à -20°C, et plus de deux ans à -70°C (Wilkinson, 1989).

Dans les fluides biologiques tels que le sang, le virus résiste 3 heures à un chauffage à +50°C (Kowalenko *et al.*, 1965) et de 70 à 190 jours dans du sang séché conservé à +20°C. Dans du sérum, le virus reste infectieux après 3h et demie à +56°C, un mois à +37°C et 18 mois à température ambiante.

Même s'il s'est montré résistant aux nucléases ainsi qu'aux protéases telles que la trypsine ou la pepsine (Bengis *et al.*, 1997, Plowright and Parker, 1967; Plowright *et al.*, 1994), le virus PPA est sensible à des nombreux traitements chimiques. Son enveloppe externe, de nature lipidique, est très sensible aux solvants, aux détergents, aux agents oxydants (Krug *et al.*, 2011) et aux désinfectants paraphénylphénoliques (Turner *et al.*, 1999 ; Crucière., 2003) chlorés ou iodés (Shirai *et al.*, 2000). Le virus est également inactivé après incubation d'une heure à +37°C dans la bêta-propiolactone, l'acétyl-éthylène et le glycéraldéhyde, ou 4 jours dans la formaline à 0,5% (Shirai *et al.*, 1999).

III. Prophylaxie – lutte contre la maladie

Malgré plusieurs décennies de recherche, aucun vaccin efficace n'a encore pu être développé contre le virus PPA. Plusieurs stratégies vaccinales ont été élaborées, utilisant des souches virales naturellement atténuées ou délétées de gènes de virulence (Alfonso *et al.*, 1998 ; Lewis *et al.*, 2000 ; Salguero *et al.*, 2008), des protéines immunogènes (Neilan *et al.*, 2004 ; Ivanov *et al.*, 2011) ou de l'ADN vaccinal (Perez-Martin *et al.*, 2006 ; Argilaguet *et al.*, 2011 ; Lacasta *et al.*, 2011), mais aucun n'est parvenu à offrir une protection efficace et complète des porcs. Cette situation est probablement due au fait que certains effecteurs de la réponse immunitaire restent encore largement méconnus et que le virus a développé de multiples mécanismes d'échappement aux défenses immunitaires. Tous les essais de protection réalisés jusqu'à maintenant ont permis au mieux une protection contre un virus homologue ou un retard dans l'apparition des signes cliniques (Sanchez-Vizcaino, 2006). Il n'existe pas non plus de traitement contre la peste porcine africaine. En conséquence, pour l'heure, seules des mesures sanitaires offensives ou défensives drastiques peuvent être mises en œuvre pour lutter contre l'expansion de la maladie.

Ces mesures sont organisées de deux manières, selon le statut sanitaire du pays. Dans les pays indemnes de PPA, les mesures de prophylaxie seront défensives, avec pour but d'empêcher toute introduction du virus dans le pays. Elles consistent en l'interdiction d'importer des animaux vivants et des produits carnés issus de porc à partir des zones infectées. Pour les autres pays, la démarche prophylactique sera plutôt offensive. Dans les pays subsahariens où il existe un cycle sauvage de transmission, la claustration des animaux permettra l'arrêt des contacts entre les animaux porteurs de virus et les animaux sains et ainsi la réduction du risque de transmission du virus.

Enfin, dans les pays où le virus est introduit pour la première fois, le contrôle de l'épidémie consistera en une élimination systématique des animaux malades et en contact avec eux dans un périmètre de sécurité défini. L'OIE recommande ainsi un rayon de 10 km autour des foyers pour les élevages intensifs et de 50 Km pour les élevages extensifs (Geering *et al.*, 2001). Les carcasses devront être détruites par incinération et tous les matériels et surfaces désinfectés. L'introduction de nouveaux animaux dans cet environnement ne se fera qu'après une période minimum de 40 jours suivie d'une introduction d'animaux sentinelles pour s'assurer de l'élimination effective du virus dans l'environnement (Crucière, 2003 ; Penrith *et al.*, 2004).

IV. Diagnostic

La peste porcine africaine est une des maladies les plus importantes du porc domestique, classée à ce titre par l'OIE parmi les maladies à déclaration obligatoire. Son grand pouvoir de diffusion, au-delà des frontières, exige d'en effectuer un diagnostic rapide et fiable afin que les mesures sanitaires prises en réponse à un foyer soient les plus efficaces possibles. En l'absence de vaccin, les efforts doivent être concentrés sur une détection précoce, premier pas vers l'application des mesures appropriées de contrôle et la mise en place des programmes d'éradication efficaces.

1. Diagnostic clinique

Des taux de mortalité très élevés chez les porcs domestiques de tout âge associés aux signes cliniques et lésions précédemment décrits devraient amener à effectuer rapidement un diagnostic de suspicion de la peste porcine africaine. Néanmoins, malgré des signes cliniques clairs, le diagnostic clinique de la PPA s'avère souvent difficile, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, du fait de l'apparition des formes cliniques subaigües et chroniques de la maladie, au cours desquelles la symptomatologie varie beaucoup, avec des formes d'évolution lente, des taux de mortalité plus bas et la possibilité d'animaux porteurs plus ou moins symptomatiques. Ensuite, parce que certains signes cliniques sont associés à d'autres maladies microbiennes touchant les porcs, ou sont les conséquences des intoxications auxquelles les porcs domestiques sont très sensibles. Il est de fait très important de ne pas confondre la PPA avec la peste porcine classique, due à un virus à ARN, le virus CSFV (pour « classical swine fever virus »), et dont les signes cliniques et les lésions sont identiques à ceux observés en cas de PPA. La confusion entraîne souvent un retard de diagnostic permettant la dissémination du virus et donc l'aggravation des épidémies. Un diagnostic différentiel doit également être fait avec certaines maladies du porc qui se manifestent par des signes cutanés, respiratoires et digestifs, comme le rouget, les septicémies à *Pasteurella multocida* (type B et E), les salmonelloses, la maladie d'Aujeszky, les gastroentérites transmissibles du porc, les rickettsies et les protozoaires tels que *Trypanosoma suis*. La PPA doit également être différenciée des lésions hémorragiques occasionnées par les empoisonnements aux rodenticides coumariniques (aflatoxines et stachybotryotoxines) (Crucière, 2003) qui ont fréquemment lieu suite à l'ingestion de rats empoisonnés ou de champignons lors du nourrissage. Par conséquent, dans tous les cas, un

diagnostic de laboratoire doit être effectué pour confirmer l'infection au virus PPA et éviter toute confusion.

2. Diagnostic de laboratoire

Une grande variété de tests de laboratoire est disponible pour la détection du virus PPA ou celle des anticorps spécifiques générés par les animaux en réponse à l'infection (Arias et Sánchez-Vizcaino, 2002 ; OIE, 2008). Ils permettent une détection rapide et précise des porcs porteurs ou ayant été en contact avec le virus PPA. Les techniques les plus fréquemment utilisées pour la détection du virus sont la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), outil diagnostic le plus spécifique, le plus sensible et le plus rapide (Agüero *et al.*, 2003 ; King *et al.*, 2003), l'immunofluorescence directe (Bool *et al.*, 1969), et l'hémadsorption (HA) (Malmquist et Hay, 1960). Bien que différentes techniques aient été décrites (Steiger *et al.*, 1992 ; Agüero *et al.*, 2004 ; Hjertner *et al.*, 2005 ; Basto *et al.*, 2006 ; Giammarioli *et al.*, 2008 ; James *et al.*, 2010 ; McKillen *et al.*, 2010 ; Ronish *et al.*, 2011), le diagnostic moléculaire de la PPA repose néanmoins sur un nombre assez restreint de méthodes de PCR conventionnelle et en temps réel (Agüero *et al.*, 2003 ; King *et al.*, 2003 ; Zsak *et al.*, 2005 ; Fernández-Pinero *et al.*, 2012). Certaines permettent non seulement la détection du virus PPA, mais aussi la caractérisation des isolats. Ainsi, Bastos *et al.* (2003), puis Lubisi *et al.* (2005), via l'utilisation de la partie 3'-terminale du gène B646L codant pour la protéine de capsid VP72, ont réussi à discriminer les isolats viraux en 22 géotypes. Si ces techniques moléculaires sont rapides, spécifiques et sensibles, l'OIE préconise également l'isolement viral comme preuve définitive de la présence de virus infectieux dans les prélèvements.

L'isolement du virus sur porc a été beaucoup pratiqué par le passé (Malmquist et Hay, 1960). Cependant, sa mise en œuvre est complexe, n'exonère pour autant pas d'un diagnostic différentiel avec la peste porcine classique et est éthiquement très contestable. L'avènement des techniques de culture cellulaire a depuis remplacé cette méthode, et aujourd'hui l'isolement viral consiste à inoculer des cultures de monocytes ou de macrophages de porc provenant du sang périphérique, de la moelle osseuse ou du poumon. La multiplication du virus dans ces cellules est mise en évidence par l'observation d'un effet cytopathique et de la propriété d'adsorption des hématies sur les cellules exprimant les antigènes viraux. L'effet cytopathique consiste en un dommage cellulaire (vacuolisation, agrégats de 5 à 10 cellules, augmentation de la granulosité cytoplasmique,

lyse), et l'hémadsorption se traduit par la formation de rosettes. Cependant, l'émergence de certaines souches de virus à la fois non hémadsorbantes et faiblement cytopathiques rendent l'emploi de l'isolement viral non suffisant pour un diagnostic sûr. L'isolement viral sur cellules tiendra donc lieu de confirmation, et sera toujours associé à une technique de diagnostic moléculaire, capable *a priori* de détecter l'ensemble des isolats viraux (Gonzague *et al.*, 2001 ; Crucière, 2003 ; Penrith *et al.*, 2004).

Pour que le résultat d'un test diagnostic puisse être considéré comme fiable, les prélèvements à partir desquels il est effectué doivent être dans un état de conservation permettant une bonne détection. Habituellement, les prélèvements pour le diagnostic de laboratoire comprennent des morceaux d'organe (ganglions lymphatiques, rate, poumon, foie, rein) ou du sang prélevé sur anticoagulant. Ces prélèvements, qui doivent être effectués sur des animaux euthanasiés ou sur les cadavres d'animaux morts récemment, sont difficiles à réaliser sur le terrain. En effet, l'autopsie doit être réalisée en limitant au maximum les risques d'écoulement de liquides biologiques pouvant contenir de fortes charges virales, puis en détruisant les carcasses par incinération. De plus, de tels prélèvements nécessitent une chaîne de froid pour une conservation correcte. Or, l'un des problèmes majeurs en Afrique est le maintien de cette chaîne de froid entre le lieu de prélèvement et le laboratoire d'analyse.

V. Nature et objectifs de cette étude

1. Contexte

Historiquement, les premiers porcs introduits dans l'île de Madagascar étaient des animaux rustiques, introduits sur les hauts plateaux avec l'arrivée des migrants malaisiens. Cette première introduction a été suivie de celle des porcs ibériques, suite à la circumnavigation du continent africain par les portugais au XV^{ème} siècle. Ensuite, le cheptel porcin s'est principalement constitué à partir du XVII^{ème} siècle, sur la base des porcs européens et asiatiques importés. Enfin, les anciennes races européennes telles que le Yorkshire, le Middle White, le Berkshire, le Large White et la Craonnais, réputées pour

une productivité supérieure, furent introduites au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle (Centre technique de Coopération Agricole et Rurale, 2002).

Aujourd'hui, le cheptel porcin malgache compte 1,5 millions de tête, chiffre à comparer avec les 35 millions de volaille, les 9,7 millions de bovin, les 1,3 millions de caprin et les 700 000 ovins, positionnant la filière porcine au troisième rang des élevages en nombre d'animaux, mais au deuxième rang en valeur. L'élevage porcin est donc très répandu, dans toute l'île, mais avec une forte concentration d'animaux sur les hautes terres et il constitue une source de revenus et d'accès à des protéines animales importante voire vitale pour de nombreux habitants (MAEP, 2004). Parmi les races de porc présentes, la race locale (Figure 15) prédomine aussi au sein des animaux reproducteurs, aussi bien mâles que femelles. Le nombre de truies de race améliorée est quant à lui estimé à environ 8000 têtes dont plus de 5400 dans la seule province d'Antananarivo (MAEP, 2004).



Figure 15 : Un porc de race locale (Photo : T Randriamparany)

Les types d'élevage (Tableau 1) de porc rencontrés à Madagascar sont l'élevage traditionnel familial et extensif (porcs en divagation) (Figure 16), l'élevage traditionnel semi-intensif (porcs enclos), et l'élevage intensif (élevages fermés et distribution de provendes industrielles) (Ramamonjisoa *et al.*, 1998).



Figure 16 : Porcs en divagation à Ambatondrazaka (Photo : T Randriamparany)

Tableau 1 : Comparaison des types d'élevage porcin à Madagascar

Caractéristiques	Divagation	Elevage fermé
Apport de travail	Minimal	Considérable
Logement	En plein air, pièces de la maison	Bâtiment (bois, brique, terre,...)
Alimentation	Déchets alimentaires, céréales, pas de complément; peu coûteuse	Rations commerciales équilibrées : coûteuse
Eau	Eau de puits, eaux usées, sources naturelles	Réserve d'eau potable obligatoire
Production	Faible ; peut augmenter avec une meilleure nutrition et contrôle des maladies	Elevée ; mais demande beaucoup d'investissements
Reproduction	Monte naturelle extensive (contrôlée ou non)	Monte naturelle contrôlée ; insémination artificielle
Qualité de la viande	Peu grasse	Plus grasse
Système d'élevage	Système d'élevage extensif	Habituellement une seule entreprise, intensive
Soins vétérinaires	Fer, vitamines, antiparasitaires, castration ; soins traditionnels (plantes, huile de vidange), vaccinations ; occasionnels	Fer, vitamines, antiparasitaires, castration, contrôle de maladies virales, bactériennes et parasitaires fondamental pour une production efficace ; fréquents

Deux grandes maladies porcines ont sévi à Madagascar avant l'apparition de la PPA en 1997-98 : l'encéphalomyélite porcine à Teschovirus (présente depuis 1945), et la peste porcine classique (PPC) (apparue en 1965) (Roger *et al.*, 1999). Toutes deux ont causé des pertes importantes dans l'industrie porcine malgache. La PPA quant à elle semble avoir été introduite suite à l'utilisation des eaux grasses et des déchets alimentaires provenant de navires assurant la liaison entre la côte est africaine et Fort-Dauphin, dans le sud-ouest de l'île (Rousset *et al.*, 2001 ; Roger *et al.*, 2000). Dans un contexte de vaccination renforcée contre la peste porcine classique (*ramijidina* en malgache) et l'encéphalomyélite porcine à Teschovirus (*ramoletaka*), l'efficacité et/ou l'innocuité des vaccins ont été fortement remises en question par les éleveurs, qui depuis sont réticents voire refusent de vacciner leurs porcs (Rousset *et al.*, 2001). Suivant cette première entrée du virus, à partir du début de l'année 1999, un premier réseau de surveillance épidémiologique a été instauré par les services vétérinaires et une section dédiée au diagnostic de la PPA a été mis en place au sein de l'Unité de virologie de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM), avec l'appui financier de la Maison du Petit Elevage (MPE), de la Coopération Française, et de la FAO au travers d'un projet de coopération technique (PCT/FAO/MAG8923/E).

L'éradication de la PPA, qui repose sur des mesures sanitaires drastiques, demeure difficile, même sur une île. En quelques années seulement, la maladie a envahi une très grande partie du territoire et, le pays possédant des moyens financiers, de contrôle et de suivis très limités, l'éradication de la maladie n'a pas été réalisée. Ainsi, des foyers épisodiques sont toujours détectés sur l'ensemble de l'île. De plus, un cycle sauvage de maintien et de transmission du virus est potentiellement existant, avec la présence d'hôtes sauvages et du vecteur. En effet, d'une part le potamochère (*Potamochoerus larvatus* ou *lamboala* en malgache) prolifère dans de nombreuses zones du pays et peut rentrer en contact avec les porcs domestiques (Ravaomanana *et al.*, 2011), d'autre part, une espèce de tiques du complexe *O. moubata* est également présente (*O. porcinus porcinus*) et pourrait jouer à la fois le rôle de réservoir et de vecteur de la maladie (Ravaomanana *et al.*, 2011 ; Roger *et al.*, 2001 ; Goutard *et al.*, 1999).

Pour contrebalancer les effets dévastateurs de l'introduction de la PPA, un plan de relance de la filière porcine a été mis en place en 2000 par les services vétérinaires, en collaboration avec la Maison du Petit Elevage (MPE). Il s'appuie sur plusieurs arrêtés interministériels qui définissent les mesures à adopter en terme de lutte offensive et défensive contre la PPA. Ainsi, en janvier 2002, 12 verrats de race Large White ont été

importés de l'île de la Réunion en vue de l'amélioration génétique et de la reconstitution du cheptel, avec à charge pour la MPE de développer une filière d'insémination artificielle (Fournier, 2005). Trois zones pilotes d'élevage abondantes en nourriture ont été sélectionnées pour cette relance : les régions de Marovoay au nord-ouest de l'île, d'Antsirabe sur les hauts plateaux, et de Tsiroanomandidy à l'ouest. Des prélèvements, des certifications d'élevage indemne et des formations destinées aux éleveurs et techniciens ont été réalisées, des affiches et des plaquettes d'information ont été distribuées pour éduquer les éleveurs (Vidon, 2003).

La transmission du virus se faisant le plus souvent, directement d'un porc malade à un porc sain ou par contact avec du matériel ou des déchets alimentaires souillés, la divagation des porcs (très importante dans certaines régions de production), le contact lors des échanges commerciaux ou au cours des saillies, tout comme le contact avec des animaux d'autres espèces (poules, chiens, rats, etc..) agissent comme des vecteurs mécaniques d'introduction de la maladie dans les élevages (Costard *et al.*, 2009). Une étude menée en 2004 sur des porcs amenés à l'abattoir a d'ailleurs montré un taux de prévalence de l'infection variant de 14 à 18%, et en 2006 des enquêtes réalisées par la MPE ont estimé à 42,5% la proportion d'éleveurs qui déclarent avoir eu au moins un foyer de PPA au cours des années précédentes (MPE 2006).

2. Problèmes rencontrés dans les pays tropicaux

Dans les pays tropicaux et selon les régions, la température peut varier de 0°C à +45°C. Il est donc primordial de gérer la chaîne de froid lors de l'acheminement des prélèvements du terrain vers le laboratoire. La rupture de cette chaîne de froid, en effet, dégrade les échantillons, ce qui peut conduire à une perte de signal et donc à l'impossibilité de détecter des agents pathogènes. La collecte de prélèvements est rendue plus difficile par l'inaccessibilité du terrain (mauvais état ou absence d'infrastructure routière), les mauvaises conditions météorologiques et le manque de moyens logistiques.

Aussi, effectuer un maillage du territoire permettant de lutter efficacement contre la maladie requiert une procédure sûre et peu onéreuse permettant l'expédition de matériels provenant des régions les plus isolées vers les laboratoires d'analyse éliminant la chaîne de froid et prévenant la dégradation des déterminants microbiens, qu'ils soient antigéniques ou nucléiques.

3. Objectif de l'étude

Dans le monde, la PPA est donc une contrainte sanitaire majeure qui limite le développement de l'élevage porcin, ce qui a un impact important sur l'économie des pays où elle sévit, mais aussi des pays avoisinants. Il est donc primordial de pouvoir la détecter très précocement afin d'en réduire les conséquences. La prévention et le contrôle de l'infection nécessitent donc un outil de diagnostic adapté à la situation de terrain et pouvant conduire à une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la maladie.

A Madagascar, pays à vocation agricole où l'élevage porcin tient une place primordiale sur le plan économique et social, les conditions environnementales (structure vétérinaire, infrastructure, climat) ne permettent pas d'établir un maillage suffisant du territoire et donc d'obtenir suffisamment de données capables d'expliquer l'épidémiologie (maintien et transmission) de la maladie dans l'île. Le développement d'un outil adapté devrait donc permettre de pallier ces conditions défavorables.

L'émergence de la PPA en Côte d'Ivoire en 1996 a entraîné une perte de 30% du cheptel national dont 80% des porcs du secteur commercial. Si la maladie n'avait pu être maîtrisée que grâce à des mesures d'abattage et de contrôle très strictes, le pays en avait été depuis déclaré indemne. La collecte de prélèvement dans ce pays permettra ainsi de tester la spécificité de l'outil que nous allons développer.

Depuis quelques années, des méthodes d'échantillonnage à base de sang séché sur du papier filtre ne nécessitant pas de continuité de la chaîne de froid (Pitcovski *et al.*, 1999 ; Vilcek *et al.*, 2001 ; Joseph et Melrose, 2010 ; Uttenthal *et al.*, 2013) et permettant la détection de matériel génétique ont été développées (Steiger *et al.*, 1992 ; De Swart *et al.*, 2001 ; Abdelwhab *et al.*, 2011). Ces méthodes reposent sur l'utilisation de papier filtre spécialement conçu pour dénaturer les protéines et préserver les acides nucléiques (papier FTA), ou de papier filtre sans aucun additif (papier 3MM). L'utilisation de ces derniers a l'avantage de permettre également la détection d'anticorps sériques et l'isolement de certains virus puisqu'ils ne dénaturent pas les protéines. Aussi, pour contrebalancer les problèmes inhérents à l'échantillonnage en conditions tropicales, nous avons choisi de procéder à des prélèvements sur papier filtre sans additifs nous permettant par la suite de détecter le virus, de l'isoler, et de détecter les anticorps dirigés contre lui.

Le premier objectif de cette étude est donc d'évaluer les capacités du papier filtre 3MM en terme de détection du virus PPA, en appliquant à ces prélèvements un panel de tests de diagnostic comprenant la PCR conventionnelle, la PCR quantitative en temps réel,

l'isolement viral et la détection d'anticorps circulants. Pour évaluer la capacité de résistance du papier filtre aux conditions tropicales, une étude de la stabilité thermique des prélèvements sera également réalisée. Ces tests seront effectués en parallèles sur des prélèvements réalisés lors des essais vaccinaux en conditions contrôlées.

Les résultats, basés sur un large échantillonnage tant à Madagascar qu'en Côte d'Ivoire, serviront par la suite à évaluer la prévalence de la PPA dans les deux pays et donc d'apprécier le risque représenté par la PPA dans ces régions, ce qui constitue le second objectif de cette étude.

Enfin, à Madagascar, l'hypothèse qui prévaut est que l'épidémie de PPA qui a eu lieu dans l'île a fait suite à l'introduction unique d'une seule souche virale. Il sera donc procédé à un séquençage partiel de souches isolées entre 2008 et 2010 pour caractériser ces souches au niveau moléculaire, et une analyse phylogénétique des souches malgaches sera effectuée pour mieux comprendre les relations reliant les souches virales entre elles. L'évolution d'une population virale ayant un seul ancêtre commun sera étudiée, ce qui constitue le troisième objectif de cette étude.

Chapitre III

TRAVAUX DE RECHERCHE

I. MATERIELS ET METHODES

Cette partie décrit les matériels et méthodes qui ont été mis en œuvre lors de cette étude. Les travaux ont été réalisés à partir de trois campagnes d'échantillonnage. La première a été réalisée à Madagascar, la seconde en Côte d'Ivoire (prélèvements « terrain ») et la dernière lors des infections expérimentales effectuées par trois laboratoires européens (ANSES (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Ploufragan, France), CReSa (Centre de Recerca en Sanitat Animal, Barcelone, Espagne) et CISA (Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid, Espagne). Les échantillons biologiques sont donc issus de porcs domestiques et de porcs EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiques) infectés expérimentalement. L'ensemble de ces prélèvements a été utilisé pour déterminer la sensibilité et la spécificité des différentes méthodes de diagnostic effectuées à partir de sang séché sur du papier buvard comparé ensuite à des prélèvements plus classiques, à savoir du sang complet prélevé sur anticoagulant ou des fragments d'organe. Les analyses sérologiques et virologiques ont été effectuées en partie au Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire (LNDV) de Madagascar, et en partie au CIRAD (Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France).

1. Echantillons

Sur le terrain, différents types d'échantillon ont été collectés selon le statut des animaux. Du sang complet a été prélevé sur tube EDTA et appliqué sur du papier buvard Whatman 3MM (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) lors de l'abattage d'animaux à l'abattoir ou dans des aires d'abattage collectives. Après une prise de sang sur la face supérieure de l'oreille des animaux, des bandelettes de papier buvard de 5cm x 1cm ont été imbibées de sang complet, séchées à température ambiante puis conservées comme décrit par Michaud *et al.*, (2007). Les sérums ont été récupérés après une centrifugation de 5 minutes à 600 g, puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Après autopsie de l'animal, un fragment d'organe cible du virus PPA (rate, rein ou ganglions lymphatiques) de 5 cm³ environ a été prélevé et placé immédiatement à +4°C. Les fragments d'organe ont ensuite été congelés dans de l'azote liquide pour assurer le transport vers le laboratoire, puis placés à -80°C pour conservation jusqu'à leur utilisation.

Dans les élevages, tout comme lors des expérimentations animales en milieu contrôlé, seul le sang a été prélevé sur les animaux sur pied, en tube EDTA et sur papier buvard Whatman 3MM.

1.1. Echantillons prélevés lors des études expérimentales

Des prélèvements de sang sur tubes EDTA, sur tubes secs et sur buvards ont été effectués au cours de quatre expérimentations animales réalisées dans le cadre des essais vaccinaux ou d'étude de virulence utilisant plusieurs souches de virus PPA.

La première expérimentation animale, réalisée au CISA en 2009, avait pour but d'étudier la virulence de la souche Arm07 (génotype II), isolée en 2007 sur porc domestique lors d'un foyer en Arménie. Pour cette étude, six porcs ont été utilisés : quatre porcs (C1 – C4) inoculés par voie intra musculaire et avec une dose de 10 HAD₅₀, et deux porcs C5 – C6 non inoculés mais placés dans le même enclos au contact des porcs inoculés. Les prélèvements de sang ont été effectués à 0, 5, 9 et 12 jours après l'infection.

Cette expérimentation animale a permis de comparer la détectabilité par PCR du virus PPA à partir de sang complet et de sang imprégné sur papier buvard 3MM, ainsi que la performance du papier 3MM comme support de prélèvement face à un autre papier buvard, le papier FTA (Braae *et al.*, 2013).

La seconde expérimentation animale a été conduite au CReSA en 2011 dans le cadre d'une étude comparative de la virulence de différentes souches de virus. Au cours de cette étude, deux groupes de trois porcs ont été infectés avec une dose de 10⁴ HAD₅₀ de la souche Ben97/1 ou de la souche E75, toutes deux appartenant au génotype I viral. Les prélèvements ont été effectués à 1, 2 et 4 jours après l'inoculation pour le groupe de porc 1 et à 3, 5, 7 et 9 jours pour le groupe 2.

Les troisième et quatrième expérimentations animales ont été réalisées à l'ANSES Ploufragan en 2011. Concernant la troisième, il s'agit d'un essai vaccinal utilisant des souches virales du génotype I. Au cours de cet essai, sept porcs ont été infectés avec une dose de 10⁴ HAD₅₀ de la souche OURT88/3, une souche naturellement atténuée isolée au Portugal en 1988. Après 21 jours, une première épreuve infectieuse a été réalisée avec

10^4 HAD₅₀ de la souche OURT88/1, une souche très proche de la première, mais virulente. Enfin, 21 jours plus tard, les porcs ont subi une seconde épreuve infectieuse utilisant 10^4 HAD₅₀ de la souche virulente Ben97/1 (isolée au Bénin en 2007). Les prélèvements ont été effectués à 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 41, 45 et 49 jours après l'infection.

La dernière expérimentation correspondait quant à elle une étude comparant deux méthodes de vaccination, par inoculation d'un peptide ou par l'utilisation d'une ou plusieurs souches virales. Au cours de ces études, 16 porcs ont été vaccinés (les souches de virus « vaccinales » ont été tenues confidentielles) à J0 et à J14 puis infectés avec 10^4 HAD₅₀ de la souche d'épreuve E75 (génotype I) à J28. Les prélèvements ont été effectués à 27, 35, 42 et 49 jours après la première inoculation.

1.2. Echantillonnage « terrain »

A Madagascar, un échantillonnage de porcs domestiques provenant des zones infectées a été effectué de 2008 à 2010 dans les abattoirs et les élevages (Tableau 2). Les prélèvements ont eu lieu suite à la suspicion d'un foyer sur le terrain ou au cours des campagnes de surveillance active. Dans ce dernier cas, les sites de prélèvement, localisés sur la Figure 17, ont été choisis selon deux critères : l'importance de l'élevage porcin implanté et la présence simultanée d'élevage et d'abattoir. Madagascar est divisé en 22 régions, issues du redécoupage des 6 anciennes provinces. Sur ces 22 régions, 13 ont été visitées à des fins de collecte, chacune des 6 anciennes provinces étant représentées par au moins une région.

Tableau 2 : Nature et lieu de prélèvement des échantillons collectés à Madagascar et en Côte d'Ivoire entre 2008 et 2010

A									
Pays	Madagascar							Côte d'Ivoire	
Année	2008			2009			2010	2009 - 2010	
Prélèvements	Sérum	Papier buvard	Rate	Sérum	Papier buvard	Rate	Rate	Sérum	Papier buvard
Abattoirs	30	30	30	115	115	115	45	-	-
Elevages	-	-	-	422	-	-	-	346	346

Zones de collecte des prélèvements de Madagascar

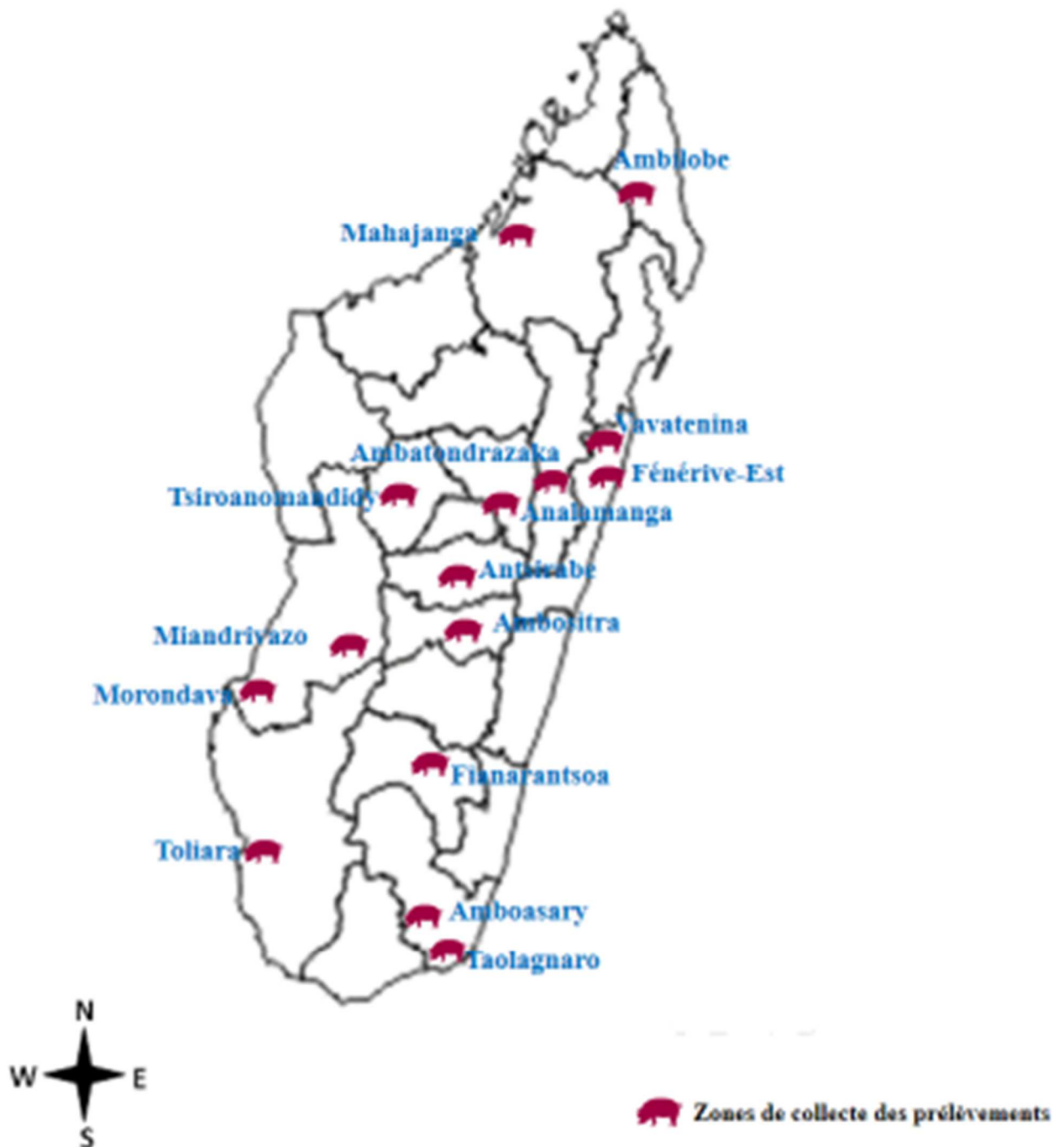


Figure 17 : Sites de prélèvement à Madagascar au cours des années 2008 à 2010

La Côte d'Ivoire a été déclarée indemne de PPA depuis au moins 10 ans suite aux foyers apparus en 1996. Lors d'une campagne de surveillance en 2009 – 2010, 346 porcs ont été prélevés à l'abattoir du district d'Abidjan qui, étant le seul abattoir de ce type dans le pays, est le lieu de convergence de la plupart des porcs destinés à l'abattage, ainsi que sur des animaux sur pied dans la région de Béoumi (centre du pays). Au total, 246 échantillons provenant des animaux élevés en élevage moderne (porcs élevés en claustration) et 100 provenant d'élevage traditionnel (porcs coureurs ou en divagation) ont été prélevés. Ces échantillons, qui consistaient en du sang séché sur papier filtre 3MM et du sérum ont été utilisés dans notre étude afin d'évaluer la spécificité des méthodes mises en œuvre.

Zones de collecte des prélèvements en Côte d'Ivoire

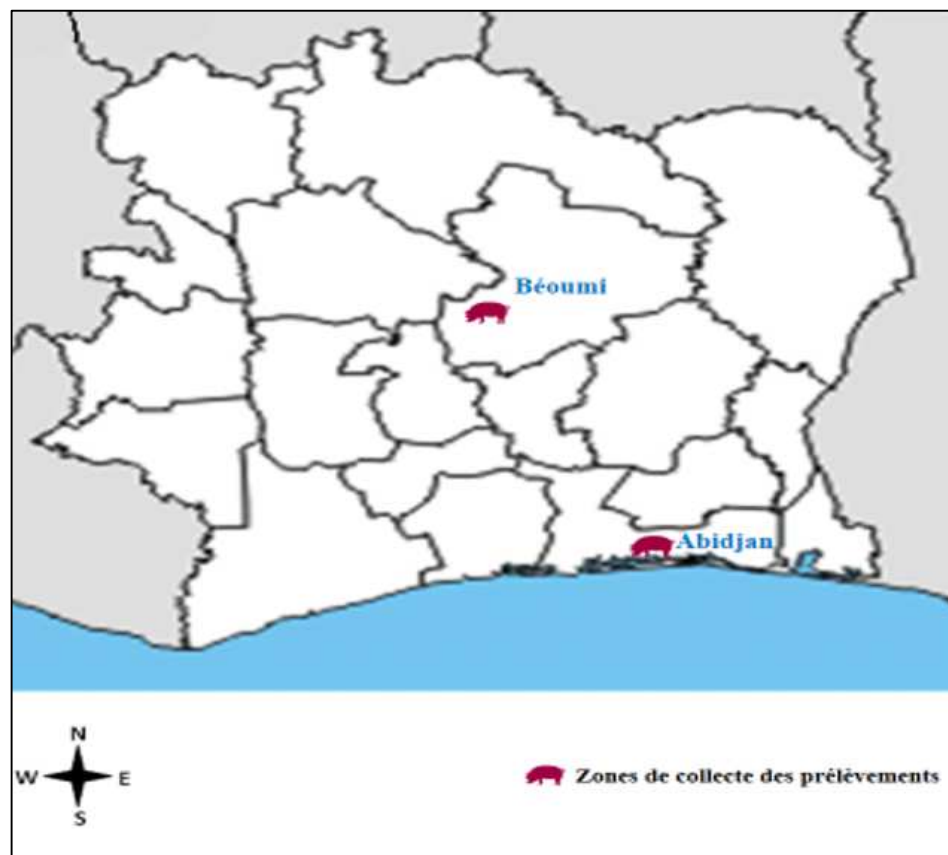


Figure 18 : sites de prélèvement en Côte d'Ivoire au cours des années 2009 à 2010

2. Influence de la taille du fragment de papier filtre sur la détectabilité du virus PPA

Des bandelettes de papier filtre de 5 cm X 0,5 cm ont été imbibées avec des dilutions de virus PPA dans du sang complet de porc. Les dilutions de raison 3 ont été réalisées à partir d'une culture virale de la souche E70 (génotype I) titrant à $10^{5,8}$ HAD₅₀, soit de $3 \times 10^{4,8}$ à $3 \times 10^{1,8}$ particules virales par ml. Les bandelettes de papier filtre ont été plongées dans les tubes contenant les différentes dilutions, séchées à l'air libre, puis conservées à température ambiante (22°C – 25°C) jusqu'à utilisation.

Pour évaluer l'influence de la taille du fragment de papier filtre dans la détectabilité du virus PPA, le diagnostic moléculaire par PCR a été réalisé sur des morceaux de 0,3 mm² à 6,25 mm².

3. Traitement des échantillons

Les analyses virologiques et sérologiques qui ont été effectuées à partir des prélèvements ont pour objectifs de valider les techniques de détection à partir de buvard imprégné de sang et de caractériser les souches de virus au moyen de reconstruction phylogénétique portant sur plusieurs parties du génome. Ces analyses comprennent la détection des anticorps dirigés contre le virus, la détection moléculaire du virus par des techniques d'amplification génique conventionnelles ou en temps réel, ainsi que l'isolement viral. Les produits d'amplification générés au moyen de la PCR conventionnelle ont été séquencés afin de caractériser les souches malgaches au niveau moléculaire et de déterminer les relations phylogénétiques existant entre elles ainsi qu'avec les autres génotypes viraux.

3.1. Analyses sérologiques : détection des anticorps dirigés contre le virus PPA par la méthode ELISA

Quarante-six échantillons provenant des essais vaccinaux réalisés lors de la troisième expérimentation animale (cf. supra) ont été utilisés pour la détection d'anticorps dirigés contre le virus PPA dans le sang séché sur papier filtre. Le kit employé pour la détection a été le kit commercial « Ingezim PPA 3 Compac » (Ingenasa, Espagne) dont le protocole a été adapté à l'utilisation de sang séché sur une matrice.

Le test a été réalisé comme suit : un fragment de 40 mm² de papier filtre imbibé de sang séché a été découpé et plongé dans 100 µl de diluant du Kit ELISA, puis incubé pendant 2 heures à température ambiante. L'éluat a été dilué au 1/5 (au lieu de la dilution au 1/2 préconisée par le fabricant lors de l'utilisation de sérum) afin de réduire les interférences dues à la présence d'hémoglobine et donc d'augmenter la sensibilité du test. La suite du protocole suit les instructions que le fournisseur stipule pour un ELISA utilisant du sérum.

L'analyse a été faite en parallèle avec les sérums appariés provenant de la même expérimentation animale.

Afin de connaître la prévalence du virus PPA dans l'île, la détection des anticorps dirigés contre le virus dans les prélèvements de sérum de Madagascar a été réalisée avec le même kit ELISA.

3.2. Détection moléculaire du virus PPA

3.2.1. Extraction des acides nucléiques à partir des organes de porc et de sang prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA

Les organes ont été préalablement coupés en morceaux puis broyés dans du milieu de culture MEM additionné de sels de Earle (Eurobio). L'homogénat a ensuite été clarifié par centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes puis l'extraction des acides nucléiques a été réalisée à partir de 200 µl de surnageant clarifié au moyen du kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) après un traitement à la protéinase K, selon les spécifications du fournisseur. En ce qui concerne le sang prélevé sur anticoagulant, l'extraction a été réalisée à partir de 100 µl de sang complet. L'ADN extrait et purifié a été élué dans 200 µl d'eau ultra pure stérile et placé à -20°C jusqu'à utilisation.

3-2-2. Amplifications géniques

3.2.2.1. Amplification génique par PCR conventionnelles

Les deux PCR conventionnelles qui ont été mises en œuvre ciblent la partie 3' terminale du gène B646L qui code pour la protéine majeure de la capside virale, la protéine

VP72. Les amplifications ont été réalisées à partir des acides nucléiques extraits d'organe ou de sang total ou à partir du sang séché sur buvard.

3.2.2.1.1. PCR directe sur papier filtre imprégné de sang de porc

Des fragments de 2,5 mm² de papier filtre imprégné de sang provenant des porcs « terrains » ou issus des expérimentations animales ont été découpés et plongés sans traitement préalable dans un mélange réactionnel composé de 0,4 µM de chaque amorce du couple VP72-sens (5'-TCGGAGATGTTCCAGGTAGG-3') et VP72-rev (5'-CGCAAAGGATTTGGTGAAT-3') (Michaud *et al.*, 2007), 250 µM de dNTP et 2,5 unités de polymérase Pfu (Stratagene, Amsterdam), complété à 80 µl avec de l'eau ultra pure stérile. La réaction de polymérisation a ensuite été réalisée comme suit : une première étape de dénaturation de 5 minutes à +95°C, suivie de 35 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à +95°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à +55°C et 30 secondes d'élongation à +72°C. Enfin, une élongation finale de 7 minutes à +72°C a été réalisée. Les produits d'amplification ont été visualisés par illumination au rayonnement UV après migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5% en TAE 1X.

3.2.2.1.2. PCR sur acides nucléiques extraits d'organes de porc

A partir des ADN extraits d'organe de porc, le fragment de gène B646L a été amplifié dans un mélange réactionnel contenant 100 ng d'ADN, 10 µM de chaque amorce du couple VP72-d (5'-GGCACAAGTTCGGACATGT-3') et VP72-U (5'-GTACTGTAACGAAGCAGCACAG-3') (Bastos *et al.*, 2003, PCR diagnostic recommandée par l'OIE), 250 µM de dNTP et 0,5 U de polymérase (Qiagen), complété à 50 µl avec de l'eau ultra pure stérile. Après 5 minutes de dénaturation à +95°C, 30 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à +95°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à +50°C et 30 secondes d'élongation à +72°C, et une élongation finale de 7 minutes à +72°C, les produits d'amplification ont été visualisés par illumination au rayonnement UV après migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5% en TAE 1X.

3.2.2.2. Amplification génique en temps réel

Le principe de la PCR quantitative en temps réel repose sur le suivi cycle après cycle de la réaction d'amplification de l'ADN au moyen d'un marqueur fluorescent fixé sur une sonde spécifique du fragment de gène cible. L'intensité de la fluorescence mesurée sera directement proportionnelle à la quantité d'ADN initialement présent, et donc au produit d'amplification présent dans le mélange réactionnel. Deux PCR quantitatives ciblant le gène de capsid B646L ont été utilisées au cours de cette étude. L'une (recommandée par l'OIE) utilise une sonde TaqMan[®] développée par King *et al.* en 2003 tandis que l'autre utilise la sonde commerciale UPL#162 (Universal Probe Library, Roche) (Fernandez-Pinero *et al.*, 2012). Tout comme pour la PCR conventionnelle, les deux méthodes ont été utilisées avec comme matrice les acides nucléiques extraits d'organe ou de sang total ainsi qu'à partir de sang séché sur buvard sans traitement préalable. Les cycles d'amplification ont été réalisés dans un thermocycleur Mx3005P (Stratagene, Agilent technologies, Courtaboeuf, France).

La première PCR en temps réel a été réalisée dans un mélange réactionnel contenant 20 µl de Gene Expression Mastermix 2X (Applied Biosystems, Warrington, Angleterre), 0,4 µM de chaque amorce (King-s, 5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCG A-3' et King-r, 5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3'), 0,25 µM de sonde 5'-[6-carboxy-fluorescein(FAM)]-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-3'-[6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)] et 100 ng d'ADN ou 1,25 mm² de papier filtre imprégné de sang, complété à 40 µl avec de l'eau ultra pure stérile. Le mélange a alors été soumis à un cycle d'amplification consistant en 3 minutes de dénaturation à +95°C suivi de 45 cycles de 10 secondes à +95°C et 30 secondes à +58°C. La fluorescence du fluorochrome a été mesurée au cours de chaque cycle d'élongation.

En ce qui concerne la seconde PCR en temps réel, l'amplification a été réalisée également en prenant comme matrice 100 ng d'acides nucléiques extraits ou 1,25 mm² de papier filtre imprégné de sang. Le mélange réactionnel contenait 0,4 µM de chaque amorce (ASF-VP72-F, 5'-CCCAGGRGATAAAATGACTG-3' et ASF-VP72-R, 5'-CACTRGTTCCCTCCACCGATA-3'), 0,1 µM de sonde UPL#162 (5'-6-FAM-CGCCAGGA-3'-dark quencher dye) et 20 µl de Light Cycler 480 Probes Master 2X

(Applied Biosystem), complété à 40 µl avec de l'eau ultra pure stérile. Le cycle d'amplification était composé de 5 minutes à +95°C suivi de 45 cycles de 10 secondes à +95°C et 30 secondes à +60°C. Le fluorochrome a été détecté au cours de chaque cycle d'élongation.

La PCR en temps réel utilisant la sonde UPL#162 ayant très rapidement montré une sensibilité plus importante que la PCR développée par Don King, cette dernière a progressivement été abandonnée. Aussi, seule la PCR à temps réel UPL a été appliquée pour tous les échantillons.

3.3. Isolement viral

L'isolement viral a été réalisé sur des macrophages alvéolaires de porc (Malmquist et Hay, 1960) extraits du poumon de porcelet par lavage broncho-alvéolaire selon la procédure suivante. Après anesthésie et exsanguination de l'animal, le tractus cœur – poumon est prélevé. Le poumon est alors lavé avec du PBS 1X supplémenté avec 20 U/ml de pénicilline, 20 µg/ml de streptomycine et 0,5 µg/ml d'amphotéricine B (Gibco), ceci permet d'éviter la prolifération des bactéries ou des champignons présents dans les voies respiratoires. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 2 min à 370 g, lavées dans du PBS 1X additionné du même mélange d'antibiotiques/antifongiques, puis reprises dans du milieu de culture. Suite à une numération des cellules vivantes avec du colorant vital bleu trypan, celles-ci sont ensemencées dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits à une concentration de $8,5 \times 10^5$ cellules par puits, et incubées à +37°C et 5% de CO₂. Le milieu de culture est composé de MEM additionné de sels de Earle (Eurobio), supplémenté de sérum de fœtus bovin (10%), de pénicilline (20 U/ml), de streptomycine (20 µg/ml) et d'amphotéricine B (0,5 µg/ml) (Gibco).

Après une nuit d'incubation, le milieu de culture est retiré et l'isolement viral est réalisé à partir de 150 µl d'un inoculum composé de surnageants d'homogénats clarifiés d'organe, de sang complet ou d'éluats clarifiés de papier filtre imbibé de sang. Après une heure d'incubation à +37°C et 5% de CO₂, l'inoculum infectieux est retiré et remplacé par 1 ml de milieu de culture. Les cellules sont alors incubées et l'apparition d'un éventuel effet cytopathique est contrôlé quotidiennement. L'ajout de globules rouges de porc aux cultures permet quant à lui d'observer le phénomène d'hémadsorption à la surface des macrophages infectés. Au bout de 5 à 7 jours, les cultures sont soumises à deux cycles de

congélation/décongélation à -80°C, puis les surnageants sont clarifiés par centrifugation et placés à -80°C jusqu'à utilisation. L'amplification du virus est réalisée par plusieurs passages successifs.

Les inocula issus des papiers filtres ont été préparés comme suit : un morceau de bandelette de papier filtre imbibé de sang de 0,5 cm² a d'abord été plongé quelques minutes dans 350 µl de milieu MEM plus sels de Earle. Le sang séché a alors été élué du support par écrasement à l'aide d'un pilon stérile puis clarifié à 8000 g pendant une minute.

4. Détermination de la viro-prévalence et de la séro-prévalence de la PPA à Madagascar

Les résultats des analyses virologiques et sérologiques réalisées à partir des échantillons « terrain » ont été utilisés pour déterminer la viro-prévalence et la séro-prévalence (p) de la population porcine malgache. Exprimées en pourcentage, les prévalences sont calculées par la proportion du nombre d'individus positifs (n) dans l'effectif total de la population (N). Soit :

$$p = \frac{n}{N}$$

Pour tenir compte du biais lié à l'échantillonnage, les résultats de prévalence sont affectés d'un intervalle de confiance à 95% ou IC₉₅. La prévalence est alors formulée comme suit :

$$P = p \pm 2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Où p est la proportion d'animaux détectés et n le nombre d'animaux testés.

5. Caractérisation moléculaire des virus PPA malgaches

5.1. Amplification des gènes cibles

Les réactions d'amplification ont été effectuées avec la polymérase FailSafe (Tebu EPICENTRE), une enzyme très fidèle puisqu'elle incorpore les nucléotides avec un taux d'erreur de seulement $3,3 \times 10^{-5}$. Cette enzyme possède à la fois une activité endonucléasique générant des extrémités franches d'ADN mais aussi une activité 3' exonucléasique qui accroche une adénine supplémentaire (non comprise dans la matrice) en fin d'élongation. Ces propriétés permettent de procéder ensuite au clonage des produits d'amplification indifféremment dans un plasmide ouvert à extrémités franches, ou cohésives avec une thymine non appariée. Les gènes ou fragments de gène ont été amplifiés entre les couples d'amorces suivants : VP72-d (5'-GTACTGTAACGCAGCACAG-3') et VP72-U (5'-GGCACAAGTTCGGACATGT-3') pour le gène B646L, ASFp22-5'-seq (5'-AAATGAG ACCCTCCAAAAA-3') et ASFp22-3'-seq : 5'-AAAAAGGATACGATGAGCCTAATG-3') pour le gène KP177R, et p30/32-P1 (5'-TGCCAAGCATACTAAGTTG-3') et p30/32-P2 (5'-ATTTTGCTGTTTATGAATCC-3') pour le gène CP204L. Le mélange réactionnel contenait 100 ng d'ADN, 25 µl de tampon PCR FailSafe C 2X, 2,5 U de polymérase, et 0,5 µM de chaque amorce, complété à 50 µl avec de l'eau ultra pure stérile.

Les amplifications géniques ont été réalisées comme suit : un cycle de dénaturation de 5 minutes à +95°C suivi de 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à +95°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à +50°C pour les gènes CP204L et B646L ou +55°C pour le gène KP177R et d'une élongation à +72°C de 30 secondes pour le gène B646L, 45 secondes pour le gène KP177R et 50 secondes pour le gène CP204L. Une élongation finale de 7 minutes à +72°C a également été réalisée.

La taille des produits d'amplification a été contrôlée après migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1% (Qbiogene) en TAE 1X et illumination au rayonnement UV, contre un marqueur de poids moléculaire de 100 pb (Biolabs).

5.2. Clonage des amplicons – sélection des clones bactériens – préparation d'ADN plasmidique

Avant d'être clonés, les amplicons ont été purifiés après migration électrophorétique dans un gel d'agarose 0,8% en TAE 1X. Les bandes d'ADN de taille attendue ont été excisées du gel puis purifiées à l'aide du kit Ultra Free DA (Millipore) selon le protocole du fournisseur.

Le clonage des amplicons purifiés a été effectué dans le vecteur pCR 2.1-TOPO (Invitrogen), un plasmide ouvert dont les extrémités 3' se terminent par une thymine non appariée et sur lesquelles est fixée une topoisomérase, une enzyme qui permettra la ligation de l'insert dans le vecteur. Le mélange réactionnel de ligation contenait 50 ng de vecteur, l'insert dans une proportion 1:3 et 1 µl de tampon 6X, complété à 6 µl avec de l'eau ultra pure stérile.

Après 10 min d'incubation à température ambiante, des bactéries chimio-compétentes *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) ont été transformées par choc thermique avec 3 µl de réaction de ligation, puis ensemencées sur un milieu gélosé LB Agar contenant de l'ampicilline à 150 µg/ml et incubées à + 37°C pendant une nuit.

Le criblage des colonies a été effectué au moyen d'une amplification génique utilisant des amorces localisées de chaque côté du site d'insertion, ceci afin de contrôler la présence et la taille du fragment d'ADN inséré dans le vecteur. Une dizaine de colonies a été sélectionnée et directement ajoutée à un mélange réactionnel contenant 2,5 U de polymérase (Qiagen), 1 µM de chaque amorce du couple pCR2.1-5' (5'-TTTATGCTTCCGGCTCGTAT-3') et pCR2.1-3' (5'-TACAATTCACTGGCCGTCGT-3'), 200 µM de chaque dNTP, 5 µl de tampon 10X et de l'eau ultra pure stérile (qsp 50µl). Le mélange a été ensuite soumis à une amplification génique de 5 minutes à +95°C (ce qui permet l'éclatement des bactéries et donc l'accessibilité à l'ADN plasmidique), puis de 35 cycles de 50 secondes à +95°C, 50 secondes à +50°C et 50 secondes à +72°C, suivis d'une élongation finale de 7 minutes à +72°C. Les amplicons générés ont alors été visualisés par illumination au rayonnement UV après migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1% en TAE 1X contre un marqueur de poids moléculaire de 100 pb (Biolabs). Les bactéries pour lesquelles le fragment d'intérêt a été amplifié correctement ont été sélectionnées pour être multipliées afin de produire une large quantité d'ADN plasmidique, plus facilement utilisable pour le séquençage.

Chaque colonie bactérienne sélectionnée a été mise en culture dans 10 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Après une nuit d'incubation à +37°C sous agitation continue (220 t/min), les bactéries ont été centrifugées à 4000 g pendant 10 minutes. L'ADN plasmidique a alors été purifié au moyen du kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega), selon les instructions du fournisseur.

Enfin, la présence de l'insert dans l'ADN plasmidique purifié a été contrôlée par digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction EcoRI (Biolabs) suivie d'une visualisation des produits de digestion par illumination aux UV après migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5% en TAE 1X.

5.3. Séquençage des gènes d'intérêt

Suite au contrôle de la présence et de la taille des gènes ou fragments de gène cloné dans les vecteurs, le séquençage des gènes d'intérêt a été externalisé et réalisé par la société Cogenics Genome Express S.A. (Meylan, France). Chaque base a été lue deux fois, c'est-à-dire une fois sur chaque brin d'ADN.

5.4. Reconstructions phylogénétiques

Les séquences ainsi générées ont tout d'abord été vérifiées avec le logiciel Vector NTI™ version 11 (Invitrogen) à partir des électrophorégrammes produits lors du séquençage. Des alignements multiples incluant les séquences malgaches que nous avons générées ainsi que celles téléchargées à partir du site publique GenBank (réunissant les 22 génotypes décrits dans la littérature) ont ensuite été réalisés par la méthode du Clustal W (Thomson *et al.*, 1994) implémentée dans le logiciel Mega v.6 (Tamura *et al.*, 2013).

A partir des alignements il est possible de déterminer statistiquement le modèle qui décrit au mieux le processus évolutif à l'œuvre permettant d'expliquer les différences constatées entre les séquences. Les arbres phylogénétiques qui découlent de l'utilisation de ces modèles sur nos jeux de données ont été générés par la méthode du Maximum de vraisemblance, également implémentée dans le logiciel Mega v.6. Les arbres ont ainsi été construits selon le modèle évolutif Tamura-Nei, et leur robustesse testée grâce à 1000 itérations, ou bootstrap (Felsenstein, 1985). Le plus souvent, les méthodes de reconstruction phylogénétique aboutissent à des arbres non enracinés. La racine des arbres a donc été placée selon l'étude réalisée en 2013 par Michaud *et al.*

II. RESULTATS

1. Evaluation du papier filtre comme support de prélèvement pour le diagnostic

L'évaluation du papier filtre comme support de prélèvement a été réalisée à partir des échantillons artificiellement reconstitués et des échantillons naturels prélevés sur des animaux lors des infections expérimentales.

1.1. Influence de la taille du fragment de papier buvard

L'impact de la taille des fragments de papier buvard utilisés lors de la détection moléculaire du virus PPA sur la performance du papier Whatman 3MM comme support de prélèvement pour le diagnostic a été mesuré. Des bandelettes de papier buvard ont été imbibées de sang complet de porc contenant $10^{5,8}$ HAD₅₀/ml de la souche virale E70 (génotype 1). Par PCR conventionnelle, le fragment de 346 pb du gène cible B646L a été amplifié et visualisé après migration électrophorétique pour des tailles de papier buvard allant de 0,3 à 5 mm² (Figure 19). En ce qui concerne le diagnostic moléculaire par PCR UPL en temps réel, le virus a été détecté jusqu'au fragment de papier buvard de 6,25 mm². Pour la suite des tests, la taille des papiers buvards utilisée a été de 2,5 mm².

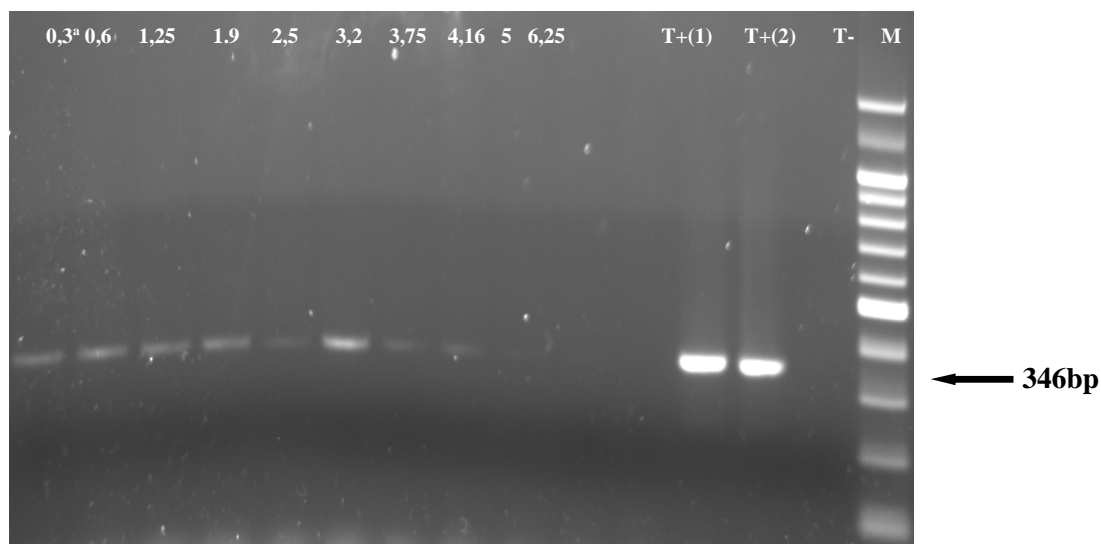


Figure 19 : Amplification d'un fragment de 346 pb du gène B646L par PCR conventionnelle : impact de la taille du fragment de papier buvard utilisé sur la détection moléculaire. La taille des fragments permettant la détection est comprise entre 0,3 et 5 mm². T+(1) : témoin positif ADN viral ; T+(2) : témoin positif FP ; T- : témoin négatif eau ; M : marqueur de poids moléculaire 100 pb.

1.2. Sensibilité

1.2.1. Limite de détection

Les limites de détection du virus PPA ont été déterminées pour chaque type de test employé pour le diagnostic. Ainsi, des PCR conventionnelles et UPL temps réel directes ainsi que des isollements viraux ont été réalisés à partir d'échantillons reconstitués composés de sang contenant de $3 \times 10^{4,8}$ à $1 \times 10^{2,8}$ HAD₅₀/ml de la souche E70, et de bandelettes imbibées de ces dilutions. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 3. Quel que soit le test et le support de prélèvement employés, la détection minimale du virus PPA a été possible jusqu'à un titre d'au moins $1 \times 10^{2,8}$ HAD₅₀. La détection à partir d'ADN extrait du sang complet montre cependant une meilleure sensibilité, avec une amplification réalisée jusqu'au titre de $3 \times 10^{1,8}$ HAD₅₀.

Tableau 3 : Comparaison de la sensibilité de détection du virus PPA à partir de papier filtre 3MM et de sang total par PCR conventionnelle directe, PCR UPL temps réel directe et isolement viral.

Titre viral (TCID ₅₀ /ml)	papier buvard			ADN extrait de sang sur EDTA	
	PCR conventionnelle directe	UPL-PCR temps réel directe	Isolement viral	PCR conventionnel le directe	UPL-PCR temps réel directe
$3 \times 10^{4,8}$	+	29,8 ^a	+	+	27,51
$1 \times 10^{4,8}$	+	32,7	+	+	29,55
$3 \times 10^{3,8}$	+	34,9	+	+	31,48
$1 \times 10^{3,8}$	+	39,4	+	+	34,89
$3 \times 10^{2,8}$	+	39,9	+	+	37,28
$1 \times 10^{2,8}$	+	41,4	+	+	38,90
$3 \times 10^{1,8}$	-	No Ct	-	+	40,56

^aCycle threshold value (Ct value)

+ = positif

- = négatif

1.2.2. Impact du support de prélèvement

Du sang prélevé sur anticoagulant ou séché sur papier buvard 3MM au cours des études expérimentales a été utilisé pour comparer l'impact du support de prélèvement sur la détectabilité du virus PPA. Les figures 19 et 20 montrent les résultats des PCR conventionnelles réalisées à partir d'ADN extrait de sang total (Figure 19) et des fragments de papier buvard appariés (Figure 20). La détection moléculaire du virus est matérialisée par l'observation de bandes d'ADN amplifié respectivement de 478 pb et de 346 pb. Même si l'intensité des bandes obtenues est plus importante lorsque l'amplification a été réalisée à partir d'ADN extrait de sang complet, la détection du virus dans le sang a été possible avec les deux supports de prélèvement. Les figures 20 et 21 illustrent l'amplification de seulement trois échantillons, mais l'ensemble des échantillons a été soumis aux deux PCR.

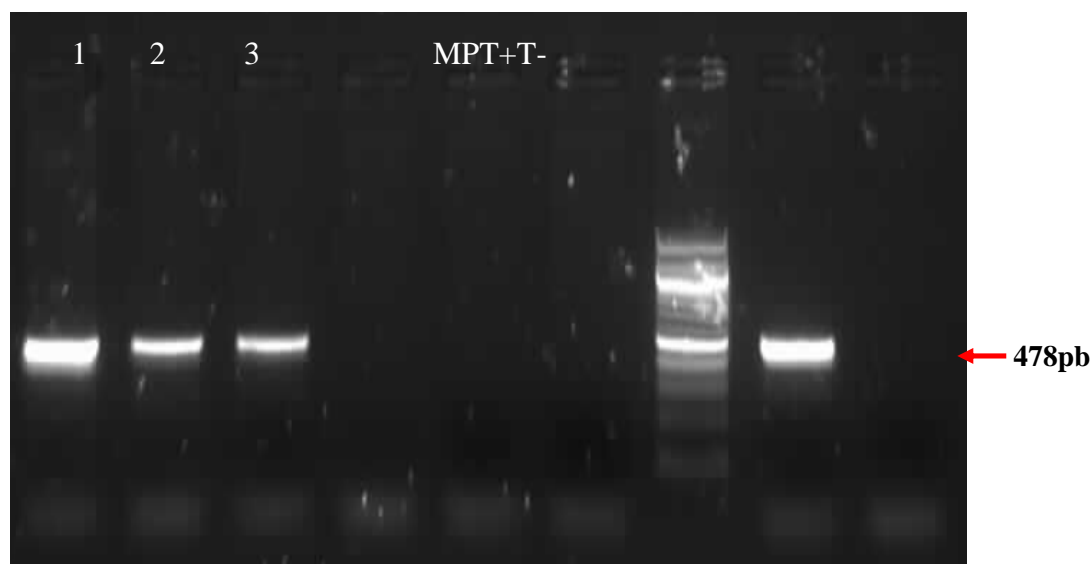


Figure 20 : Visualisation des fragments de 478 pb du gène B646L amplifiés entre le couple d'amorces VP72-d et VP72-U à partir d'ADN extrait de sang total (migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5% en TAE 1X) . Prélèvements réalisés à l'ANSES à J45 post infection : n° 1 : 110 ; 2 : 135 ; 3 : 157. T+ : témoin négatif ; T- : témoin positif. MP : marqueur de poids moléculaire

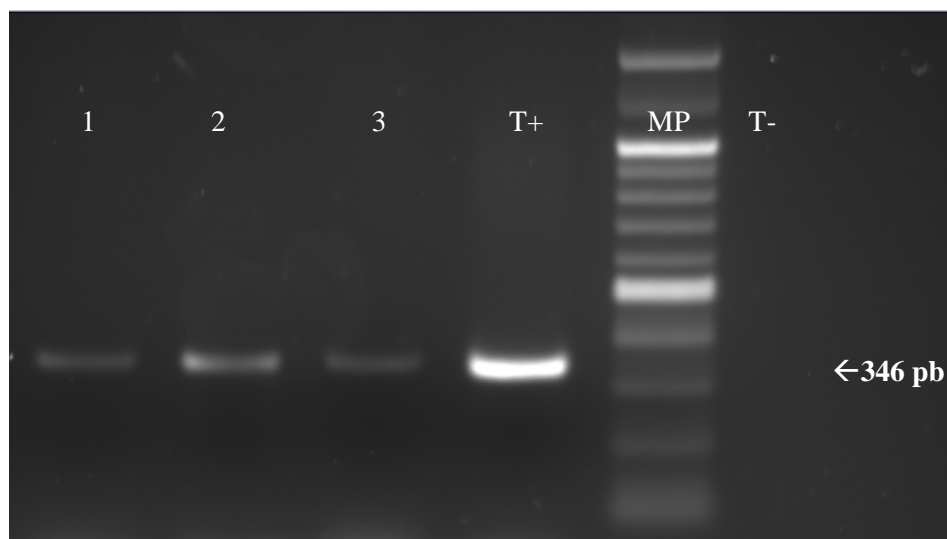


Figure 21 : Visualisation des fragments de 346 pb du gène B646L amplifiés entre le couple d'amorces VP72sens /VP72rev à partir de fragment de papier buvard imbibé de sang (migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5% en TAE IX), prélèvements réalisés à l'ANSES à J45 post infection : n° 1 :110 ; 2 :135 ; 3 :157. T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif. MP: marqueur de poids moléculaire

1.3. Sérologie

Le potentiel du papier filtre 3MM comme support de prélèvement de sang pour la détection des anticorps dirigés contre le virus PPA a été évalué à partir de 46 prélèvements réalisés au cours d'infections expérimentales. Les résultats des tests ELISA effectués à partir des papiers filtres imprégnés de sang ont été comparés à ceux obtenus à partir des prélèvements de sérums correspondants. Les sérologies effectuées à partir de sang élué du support buvard ont permis de détecter les anticorps dirigés contre le virus PPA pour 15 échantillons, contre 16 lorsque du sérum a été utilisé (Tableau 4). L'ensemble des échantillons pour lesquels des anticorps ont été détectés correspondent aux animaux ayant été inoculés avec une souche virale vaccinale. La sensibilité du test a donc été de 93,7% [IC₉₅ : 85% à 99%] à partir de papier buvard par rapport au sérum, pour une spécificité de 100%. La valeur prédictive négative (VPN) est donc de 96,8% [IC₉₅ : 93% à 100%] et la valeur prédictive positive (VPP) de 100%. Le test Kappa réalisé à l'aide de ces résultats produit un coefficient égal à 0,95, soit une concordance proche de l'absolu entre les deux méthodes de prélèvement.

Tableau 4 : Détection d'anticorps dirigés contre le virus PPA : comparaison des résultats de sérologie obtenus à partir de sang séché sur papier buvard et à partir de sérum. IC₉₅ : intervalle de confiance à 95%. VPP : valeur prédictive positive. VPN : valeur prédictive négative. Kappa : concordance des résultats obtenus avec les deux méthodes de prélèvement.

		Sérum		
		Positifs	Négatifs	Total
Papier filtre 3MM	Positifs	15	0	15
	Négatifs	1	30	31
	Total	16	30	46
Sensibilité		93,7%	-	
[IC ₉₅]		[71.7 – 98.9]		
Spécificité			100%	
[IC ₉₅]			[88.6 – 100]	
VPP		100%	-	
[IC ₉₅]		[79.6 – 100]		
VPN			96,8%	
[IC ₉₅]			[83.8 – 99.4]	
Kappa		0,95	-	

2. Analyse des prélèvements provenant des infections expérimentales:

La détection du virus PPA dans les échantillons provenant des différentes expérimentations animales a été réalisée de façon directe par PCR conventionnelle et en temps réel, par isolement, ou de façon indirecte par sérologie (cf. supra).

2.1. Expérimentation animale réalisée au CISA

Cette expérimentation animale, effectuée au CISA sur six porcs inoculés avec la souche virale Armenia 2007 (génotype 2), nous a permis non seulement de comparer la détectabilité par PCR du virus PPA à partir de sang complet et de sang imprégné sur papier buvard 3MM, mais également de comparer la performance du papier 3MM comme support de prélèvement face à un autre papier buvard, le papier FTA, spécifiquement conçu pour la conservation et la détection des acides nucléiques à partir de sang complet. La performance de ces trois supports de prélèvement, synthétisée dans le tableau 5, a été réalisée par PCR conventionnelle et montre une sensibilité égale. Par suite, la comparaison des PCR temps réel UPL et Taqman a été réalisée seulement à partir du papier buvard 3MM (Tableau 6).

A J0, le jour de l'épreuve infectieuse, tous les prélèvements sont négatifs. Par la suite et ce, quel que soit le mode de prélèvement (papier buvard 3MM, papier FTA et sang complet sur tube EDTA), le virus a été détecté par PCR conventionnelle (directe pour le papier 3MM, sur ADN extrait pour le sang total ou éluat pour le papier FTA) chez les porcs infectés avec 10 HAD₅₀ de la souche Arm07 (C1, C2, C3 et C4) à partir de J5 post-infection, et jusqu'à J9 pour le porc C1. Aucun prélèvement n'a été réalisé à J9 pour les porcs C2, C3 et C4 ni à J12 pour le porc C1 car l'évolution de la clinique de la maladie chez ces animaux a conduit à une euthanasie pour raison d'éthique. En ce qui concerne les porcs « contacts », le virus a été détecté à partir de J9 pour le porc C5 et à J12 pour le porc C6, impliquant que le virus a été excrété par les 4 porcs inoculés au cours du développement de la maladie. (Tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison des résultats de la détection moléculaire du virus PPA par PCR Conventionnelle directe entre sang EDTA / FTA / 3MM effectuée au CISA

Porc n°/ Jour	J0			J5			J9			J12		
	Sang	FTA	3MM	Sang	FTA	3MM	Sang	FTA	3MM	Sang	FTA	3MM
C1	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	-	-	-
C2	neg	neg	neg	pos	pos	pos	-	-	-	-	-	-
C3	neg	neg	neg	pos	pos	pos	-	-	-	-	-	-
C4	neg	neg	neg	pos	pos	pos	-	-	-	-	-	-
C5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos
C6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos

- : échantillons manquants suite à l'euthanasie des animaux pour raison d'éthique

La comparaison des PCR temps réel « Taqman » et « UPL » a montré une sensibilité supérieure pour cette dernière lorsqu'il agit de détecter une souche virale appartenant au génotype 1. En effet, la PCR temps réel « UPL » détecte le virus chez le porc C3 dès J5 post-infection alors que la PCR King ne le détecte pas. De la même manière, à J9 post infection, les porcs contacts ne sont détectés qu'avec la PCR « UPL » (Tableau 6).

Tableau 6 : Comparaison des résultats PCR à temps réel (Taqman et UPL) sur 3MM effectuée au CISA

Porc n°/ Jour	J0		J5		J9		J12	
	TaqMan	UPL	TaqMan	UPL	TaqMan	UPL	TaqMan	UPL
	3MM	3MM	3MM	3MM	3MM	3MM	3MM	3MM
C1	No Ct	No Ct	29,31	24,57	15,87	22,09	-	-
C2	No Ct	No Ct	23,01	27,56	-	-	-	-
C3	No Ct	No Ct	No Ct	24,60	-	-	-	-
C4	No Ct	No Ct	30,82	27,55	-	-	-	-
C5	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	40,45	No Ct	24,42
C6	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	39,68	33,00	26,99

Ct : Threshold cycle (Cycle de seuil)

- : échantillons manquants suite à l'euthanasie des animaux pour raison d'éthique

2.2. Expérimentation animale effectuée au CReSA :

Une comparaison de sensibilité entre les deux méthodes d'amplification par PCR en temps réel a également été réalisée à partir des prélèvements effectués au cours de cette étude expérimentale, dans laquelle 6 porcs ont été infectés, 3 avec la souche virale Ben97/1 et 3 autres avec la souche E75, c'est-à-dire deux souches appartenant au génotype 1 viral. Les PCR ont été réalisées à partir de sang prélevé sur papier buvard 3MM et à partir d'ADN extrait de sang total prélevé sur tube EDTA. Les résultats sont représentés dans les tableaux 7 et 8. Quel que soit le support de prélèvement, l'ADN viral a été détecté très précocement dans le sang. En effet, l'ADN viral a été détecté grâce à la PCR « UPL » dès J1 post infection chez un porc sur trois à partir de sang complet prélevé sur tube EDTA (porc n° 3697) ou de sang séché sur papier 3MM (porc n° 3703) lorsque l'épreuve infectieuse avait été réalisée avec la souche Ben97/1. La PCR « Taqman » n'a quant à elle pas permis cette détection à partir des deux supports de prélèvement. A J2 post infection, la PCR « UPL » détecte le virus dans le sang complet chez 2 animaux sur 3 et chez les trois animaux lorsque le sang est séché sur du papier buvard tandis que la PCR « Taqman » ne le détecte que dans le sang complet et pour un seul animal sur 3. Enfin, à J4 post infection le virus est systématiquement détecté avec la PCR « UPL » alors qu'il n'est détecté que chez 2 animaux sur 3 dans le sang complet et 1 animal sur 3 dans le sang séché avec la PCR « Taqman ».

Dans le cadre de l'expérimentation utilisant la souche E75 lors de l'épreuve infectieuse, dès J3 post infection, le virus est détecté chez les 3 animaux avec la PCR « UPL » pour les deux modes de prélèvement alors qu'il ne l'est qu'à partir de J5 post infection avec la PCR « Taqman » chez 2 animaux sur 3 dans le sang complet et chez les 3 animaux dans le sang séché.

Là encore, la PCR « UPL » s'est montrée plus sensible quel que soit le mode de prélèvement pour la détection de souches virales appartenant au génotype I.

Tableau 7 : Résultats de la détection du virus PPA par PCR en temps réel (TaqMan et UPL) à partir des prélèvements de sang et de buvards 3MM imbibé de sang complet réalisés lors de l'expérimentation effectuée au CReSa utilisant la souche Ben97/1 lors de l'épreuve infectieuse.

Porc n°/Jour	J1				J2				J4			
	Sang		3MM		Sang		3MM		Sang		3MM	
	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL
3694	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	35,15	23,69	28,57	No Ct	23,34
3697	No Ct	39,19	No Ct	No Ct	24,34	24,15	No Ct	33,45	No Ct	28,00	No Ct	21,26
3703	No Ct	No Ct	No Ct	40,48	No Ct	32,36	No Ct	41,31	29,00	27,75	22,64	24,00

Tableau 8 : Résultats de la détection du virus PPA par PCR en temps réel (TaqMan et UPL) à partir des prélèvements de sang et de buvards 3MM imbibé par sang complet lors de l'expérimentation effectuée au CReSa utilisant la souche E75 lors de l'épreuve infectieuse.

Porc n°/Jour	J3				J5				J7				J9			
	Sang		3MM		Sang		3MM		Sang		3MM		Sang		3MM	
	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL
1503	No Ct	32,35	No Ct	28,78	No Ct	24,86	27,43	23,86	-	-	24,96	22,33	24,54	23,41	25,85	24,45
1702	No Ct	34,58	No Ct	30,10	27,46	25,46	23,90	23,41	29,09	26,44	-	-	27,97	27,96	-	-
1747	No Ct	36,00	No Ct	31,92	27,53	25,95	27,03	22,85	-	-	-	-	-	-	-	-

2.3. Expérimentations animales réalisées à l'ANSES

Tout comme l'expérimentation effectuée au CReSA, cette expérimentation a été réalisée avec des virus appartenant au génotype 1, en inoculant d'abord aux porcs la souche atténuée « vaccinale » OURT88/3 suivie de deux épreuves infectieuses successives avec les souches virulentes OURT88/1 (directement liée à la souche vaccinale) et Ben97/1. Les résultats des PCR temps réel « UPL » et « Taqman » en comparaison avec la PCR conventionnelle directe sont consignés dans le tableau 9. Suite à l'inoculation de la souche vaccinale, l'ADN viral n'a été détecté chez aucun des animaux, quelle que soit la méthode de diagnostic utilisée. Il en a été de même suite à l'inoculation de la souche qui lui est liée. En revanche, trois jours après l'infection par la souche Ben97/1, plus éloignée des deux autres bien qu'appartenant au même génotype, l'ADN viral a été détecté chez tous les animaux avec deux techniques sur trois, à savoir la PCR conventionnelle directe et la PCR temps réel UPL. La PCR temps réel « Taqman » n'a quant à elle jamais permis de détecter l'ADN viral, quel que soit le jour de prélèvement. Une semaine après la seconde épreuve infectieuse, l'ADN viral n'est à nouveau plus détectable quelle que soit la méthode utilisée. Les animaux ne sont donc plus virémiques.

Les résultats obtenus à partir des prélèvements effectués lors de la seconde expérimentation réalisée à l'ANSES (visant à déterminer le potentiel d'immunisation de peptide en comparaison de souches virales « vaccinales ») sont représentés dans le tableau 10. Ils comparent la détection moléculaire du virus PPA dans le sang selon le mode de prélèvement – sang total ou papier filtre – et selon la méthode d'amplification – PCR Taqman (King) et UPL. Ainsi, suite à l'inoculation vaccinale de peptide ou de souches virales et avant l'épreuve infectieuse de J28 tous les échantillons sont négatifs. A J35, c'est-à-dire à 7 jours après l'épreuve infectieuse, la détection du virus dans l'ADN extrait de sang complet est semblable avec les deux méthodes. En revanche, la détection directe dans du sang séché sur papier filtre est supérieure lorsqu'elle est réalisée avec la PCR UPL. Le même phénomène a été constaté lors de l'analyse des prélèvements réalisés à J42.

Tableau 9 : Résultats de la détection moléculaire du virus PPA à partir de sang séché sur papier filtre 3MM par PCR (conventionnelle directe, Taqman et UPL) chez les porcs après la « vaccination » par la souche OURT88/3 et épreuves infectieuses avec les souches OURT88/1 et Benin 97/1. Les prélèvements manquants à J49 sont la conséquence de la mort des animaux suivant la seconde épreuve infectieuse. Pour la lisibilité de ce tableau, les résultats de détection à partir de sang complet ne sont pas indiqués. Ils sont cependant identiques à ceux obtenus à partir du sang séché sur papier filtre 3MM.

	0	7 à 20	21	22 à 41	42	45	49						
Porc/ Jour	3MM			3MM			3MM						
	PCR conv	TaqMan	UPL	PCR conv	TaqMan	UPL	PCR conv	TaqMan	UPL				
110	VACCINATION OURT 88/3	-	-	-	VACCINATION OURT 88/1	-	EPREUVE BENIN 97/1	+	-	+	-	-	-
135		-	-	-		-		+	-	+			
157		-	-	-		-		+	-	+			
346		-	-	-		-		+	-	+			
426		-	-	-		-		+	-	+	-	-	-
453		-	-	-		-		+	-	+			

PCR Conv : PCR conventionnelle

Tableau 10 : Expérimentation animale n°2 réalisée à l'ANSES : comparaison de la détection moléculaire du virus PPA à partir d'ADN extrait de sang total ou à partir de sang séché sur papier filtre au moyen des PCRTaqman King et UPL. Les échantillons manquant à J42 post épreuve infectieuse font suite à l'euthanasie des animaux pour raison éthique. La PCR UPL montre une meilleure sensibilité de détection lorsque la détection est réalisée à partir de sang séché sur papier filtre 3MM.

Porc n°/Jour	J27				J35				J42			
	Sang		3MM		Sang		3MM		Sang		3MM	
	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL	Taqman	UPL
3164	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	21,53	21,5	27,8	30,94				
3174	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	20,69	20,9	28,98	31,56	26,1	27,45	No Ct	35,3
3185	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	39,58	No Ct	No Ct	No Ct	39,55	No Ct	44,77
3194	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	19,12	19,28	No Ct	30,55				
3944	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	21,26	21,38	No Ct	33,61	23,78	32,84	No Ct	33,93
3962	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	24,22	24,21	32,13	35,71	22,61	22,66	No Ct	33,56
3954	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	19,59	19,4	No Ct	30,28				
3957	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	19,59	19,36	No Ct	29,72	23,72	23,73	No Ct	36,27
3160	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	19,15	20,32	28,92	29,07				
3169	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	20,1	21,01	30,79	31,61	23,37	23,55	No Ct	35,59
3186	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	19,5	20,24	No Ct	31,06				
3206	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	18,22	19,17	No Ct	29,37				
3175	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	18,05	19,19	No Ct	29,08	24,62	24,76	36,16	30,4
3182	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	17,96	18,93	No Ct	31,22				
3942	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	38	39,01	No Ct	No Ct	27,83	27,67	No ct	40,21
3950	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	29,77	30,01	No Ct	40,09				

2.4. Bilan de la détection du virus à partir des prélèvements réalisés lors des études expérimentales

L'ensemble des résultats visant à déterminer le potentiel du papier buvard 3MM comme support de prélèvement pour le diagnostic permettant la détection du virus PPA dans le sang est synthétisé dans le tableau 11. Au total, la détection moléculaire du virus (par PCR conventionnelle directe, PCR temps réel « Taqman » et « UPL ») a été réalisée à partir de 237 prélèvements, la détection des anticorps dirigés contre la protéine virale VP72 dans 46 prélèvements et la mise en évidence du virus vivant par isolement dans 157 prélèvements.

La PCR conventionnelle a montré une sensibilité de 78,3% [IC₉₅, 68,4% - 88,2%] avec la détection de 54 échantillons positifs sur 69 supposément positifs. La détection de l'ADN viral par PCR temps réel a montré quant à elle une sensibilité de 95,7% [IC₉₅, 90,8% - 100%] avec la PCR « UPL » (66 échantillons positifs détectés) quand la PCR « Taqman » ne montrait qu'une sensibilité de 65,2% [IC₉₅, 53,7% - 76,7%] (45 échantillons détectés). La spécificité a été de 100% quel que soit le test utilisé, avec une valeur prédictive positive égale elle aussi à 100%. Cependant, des échantillons supposés positifs n'ont pas été détectés, aussi les valeurs prédictives négatives sont respectivement de 87,5%, 91,8% et 98,2% (avec des kappa de 0,72, 0,90 et 0,96) pour les PCR temps réel Taqman, conventionnelle direct, et « UPL » temps réel.

Enfin, tous les prélèvements dans lesquels l'ADN viral a été détecté ont pu être confirmés par isolement viral sur culture de macrophages alvéolaires de porcs.

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des résultats de détection du virus PPA à partir des prélèvements effectués lors des différentes expérimentations animales. Les PCR conventionnelles directes, temps réel « Taqman » et « UPL » ont été réalisées à partir de 237 prélèvements, la détection des anticorps dirigés contre la protéine virale VP72 dans 46 prélèvements (dont 16 supposément positifs selon le protocole expérimental), et la mise en évidence du virus vivant par isolement à partir de 157 prélèvements

Test 3MM	Sérologie		PCR conventionnelle		Taqman PCR temps réel		UPL PCR temps réel		Isolement viral	
Etat des porcs	Déecté	Non Déecté	Déecté	Non déecté	Déecté	Non déecté	Déecté	Non déecté	Déecté	Non déecté
Positif	15	1	54	15	45	24	66	3	66	3
Négatif	0	30	0	168	0	168	0	168	0	88
Sensibilité	93,7%		78,3%		65,2%		95,7%		95,7%	
	[IC ₉₅ , 71.7–98.9%]		[IC ₉₅ , 68,4% - 88,2%]		[IC ₉₅ , 53,7% - 76,7%]		[IC ₉₅ , 90,8% - 100%]		[IC ₉₅ , 90,8% - 100%]	
Spécificité	100%		100%		100%		100%		100%	
	[IC ₉₅ , 88.6–100%]		[IC ₉₅ , 99% - 100%]		[IC ₉₅ , 99,7% - 100%]		[IC ₉₅ , 99,7% - 100%]		[IC ₉₅ , 99,4% - 100%]	
Valeur prédictive positive	100%		100%		100%		100%		100%	
	[IC ₉₅ , CI, 79.6–100%]		[IC ₉₅ , 99,1% - 100%]		[IC ₉₅ , 98,9% - 100%]		[IC ₉₅ , 99,2% - 100%]		[IC ₉₅ , 99,2% - 100%]	
Valeur prédictive négative	96,8%		91,8%		87,5%		98,2%		100%	
	[IC ₉₅ , 83.8–99.4%]		[IC ₉₅ , 87,7% - 95,9%]		[IC ₉₅ , 82,7% - 92,3%]		[IC ₉₅ , 96,1% - 100%]		[IC ₉₅ , 92,9% - 100%]	
K (Kappa test)	0,95		0,90		0,72		0,96		0,96	

3. Analyse des échantillons « terrains »

3.1. Echantillons provenant de Madagascar

3.1.1. Détermination de la séroprévalence du virus PPA à Madagascar par ELISA

La prévalence de la PPA à Madagascar a été estimée par l'analyse de 567 sérums de porc domestique (30 en 2008 et 537 en 2009) prélevés dans des élevages et des abattoirs. La détection des anticorps dirigés contre le virus PPA a été réalisée au moyen d'un test ELISA de compétition (Tableau 12). Sur l'ensemble des animaux testés, des anticorps ont été détectés chez un seul animal, prélevé en 2009 dans un élevage situé à Beravina dans la région de Matsiatra Ambony (Figure 21). La séroprévalence observée a donc été de 0,17%.

Tableau 12 : Résultats sérologiques effectués chez les sérums de porcs collectés en 2008 - 2009

Prélèvements	Négatif	Positif	Total	% [IC à 95%]*
Abattoirs	145	0	145	0
Elevages	421	1	422	0,23
Total	566	1	567	0,17

* [IC₉₅] : Intervalle de confiance à 95%

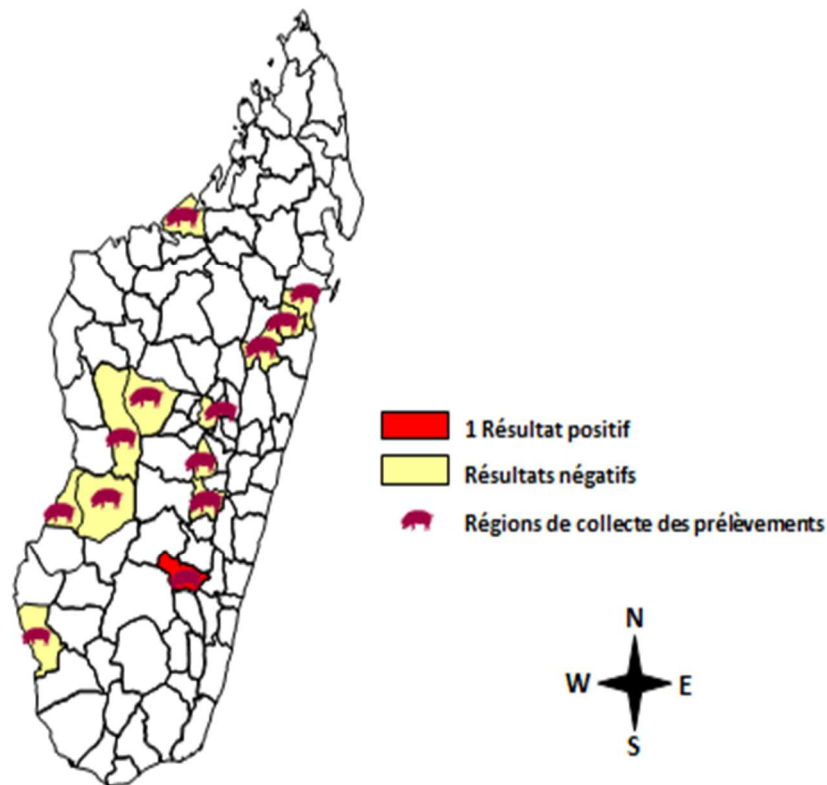


Figure 22 : Communes où les prélèvements de sérum ont été effectués en 2008 et 2009 et présentant l'échantillon séropositif

3.1.2. Détection moléculaire du virus PPA

La détection moléculaire du virus PPA a été réalisée par amplification génique conventionnelle ou temps réel d'un fragment du gène conservé B646L à partir d'ADN extrait d'organe.

Sur les 166 échantillons analysés, l'ADN viral a été détecté par PCR conventionnelle chez 28 d'entre eux, soit une prévalence virologique de 17,8% [IC₉₅ : 10,26% à 25,66%]. La localisation des prélèvements positifs est indiquée sur la figure 27.

Parmi ces 166 organes, 91 collectés à l'abattoir ont eu des papiers buvards 3MM correspondants. Pour observer l'impact du vieillissement sur la qualité de détection à partir du support de prélèvement buvard, la détection moléculaire par PCR conventionnelle a été réalisée à partir de l'ADN extrait d'organe et du sang séché sitôt après prélèvement. Après 9 mois de conservation à température ambiante, les résultats se sont avérés identiques, avec la détection de 14 animaux positifs.

Zones de collecte de prélèvements à Madagascar

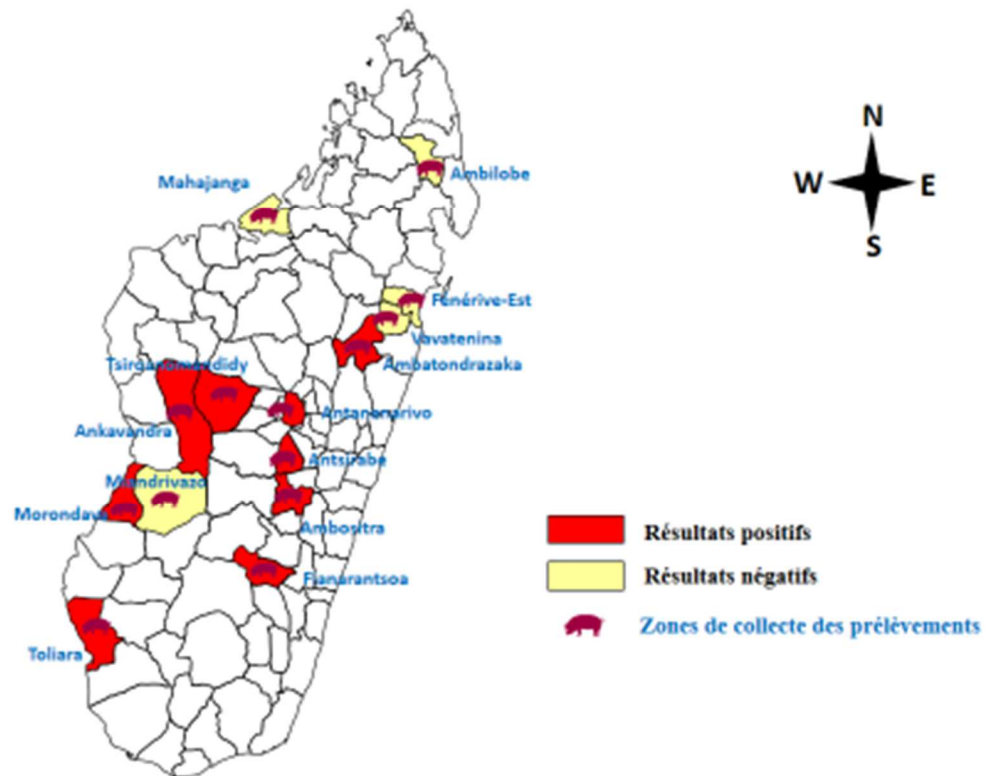


Figure 23 : Communes dans lesquelles ont été effectués les prélèvements d'organe et de sang séchés sur papier filtre 3MM de 2008 à 2010, et résultats de détection du virus PPA

Une analyse comparant la détection par PCR conventionnelle et temps réel « King » et « UPL » a également été réalisée à partir de ces prélèvements appariés (Tableau 22). Elle a montré respectivement une sensibilité de 87.5% [IC₉₅ : 70.9–100%], 75% [IC₉₅ : 53.3–96.7%] et 93,8% [IC₉₅ : 81.7–100%], avec une spécificité de 100% pour les deux PCR. Les VPP ont été de 100% et les VPN associées ont été respectivement de 97.4% [IC₉₅ : 93.8–100%], 94.9% [IC₉₅ : 87.6–98%] et de 99,76% [IC₉₅ : 99.4–100%].

Tableau 13 : comparaison des PCR conventionnelle et temps réel UPL et King réalisées à partir de sang séché sur du papier buvard 3MM et d'ADN extrait de rate de porc prélevés à Madagascar en 2009.

3MM	Rate					
	PCR Conventionnelle		TaqMan PCR		UPL PCR	
	Animal	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif
Positif	14	2	12	4	15	1
Négatif	0	75	0	75	0	75
Sensibilité	87.5% [IC 95%, 70.9–100]		75% [IC 95%, 53.3–96.7]		93,75% [IC 95%, 81.7–100]	
Spécificité	100% [IC 95%, 99.1–100]		100% [IC 95%, 95.1–100]		100% [IC 95%, 99.2–100]	
VPP	100% [IC 95%, 78.5–100]		100% [IC 95%, 80.6–100]		100% [IC 95%, 80.6–100]	
VPN	97.4% [IC 95%, 93.8–100]		94.9% [IC 95%, 87.6–98]		99,76% [IC 95%, 99.4–100]	
Kappa test	0,92		0,83		0,96	

3.2. Analyse des prélèvements provenant de Côte d'Ivoire

3.2.1. Détection moléculaire de l'ADN du virus PPA

La PCR temps réel « UPL » a été appliquée à l'ensemble des échantillons de sang séché sur papier 3MM prélevés en Côte d'Ivoire. L'ADN du virus PPA n'a été détecté dans aucun des 346 prélèvements testés. Là encore, la spécificité de la méthode de détection s'est donc avérée être de 100%.

4. Caractérisation moléculaire des souches malgaches

Parmi les 28 prélèvements dans lesquels l'ADN du virus PPA a été détecté, 19 isolats viraux ont été caractérisés par l'analyse phylogénétique de trois gènes ou fragment de gène : 399 nt dans la partie 3' terminale du gène B646L (capside virale), et les séquences complètes des gènes KP177R et CP204L (protéines d'enveloppe p22 et p32), respectivement de 525 à 534 nt et de 585 à 615 nt. Dans ces analyses, 346 isolats (dont 15 malgaches) ont été utilisés pour étudier le gène B646L, 37 isolats (dont 14 malgaches) pour le gène KP177R et 140 séquences (dont 7 malgaches) pour le gène CP204L (Tableau 14, annexe 3). Les analyses ont été réalisées par la méthode du maximum de vraisemblance.

4.1. Analyse des séquences partielles du gène B646L qui code pour la protéine capsidiale VP72

Le fragment du gène B646L que nous avons utilisé est à l'origine de la classification des isolats de PPA en 22 génotypes. Pour cette analyse, 15 souches de Madagascar collectées à différentes périodes et en différents lieux ont été alignées avec des séquences téléchargées du site public GenBank et provenant d'isolats européens, sud-américains et caribéens, et ouest-, sud- et est-africains. Les séquences doublons ont été par la suite retirées de l'analyse et l'arbre phylogénétique représenté dans la figure 24 n'a été construit qu'à l'aide des isolats dont les séquences présentaient de la diversité. Au total, l'arbre phylogénétique a été généré suite à l'analyse de 91 isolats.

L'analyse de l'alignement a montré 68 sites polymorphiques dont 19 transversions et 49 transitions. Ces substitutions nucléotidiques étaient pour la plupart synonymes, n'entraînant que la modification de 11 acides aminés sur les 134 que compte la portion de la protéine VP72 correspondant à la zone séquencée, soit 10,4% d'acides aminés modifiés sur l'ensemble des isolats. Comme attendu, les isolats malgaches (dont les séquences montrent 100% d'homologie entre elles sur un pas de temps de 13 ans) sont situés au sein du génotype II viral.

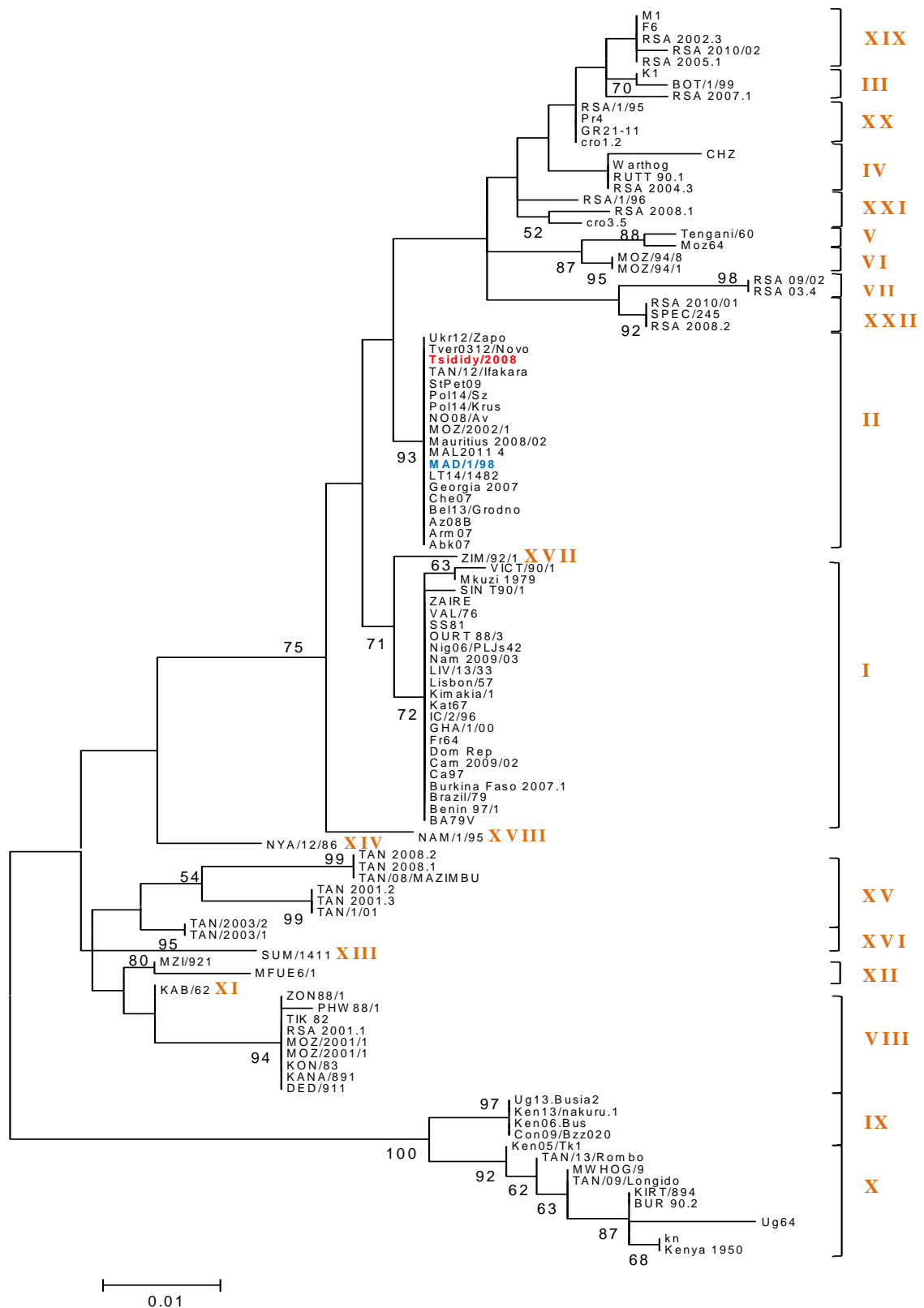


Figure 24 : Arbre phylogénétique construit en maximum de vraisemblance avec le modèle TN93 et décrivant les relations entre 91 isolats de virus PPA en provenance d'Afrique, d'Europe, d'Amérique du sud et des Caraïbes en ce qui concerne le gène B646L (capside virale). Les 22 génotypes sont représentés. Les séquences malgaches (colorées dans la figure, la couleur rouge correspondant aux séquences générées au cours de cette étude) sont situées au sein du génotype II. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 sont indiquées en face du nœud correspondant. L'échelle représente la quantité de diversité entre les isolats au sein de l'arbre.

4.2. Analyse des séquences du gène KP177R

L'amplification du gène KP177R entre les amorces spécifiques a généré un fragment d'environ 650 pb, soit le cadre de lecture complet du gène. L'alignement multiple a été réalisé à partir de fragment de 525 à 534 nucléotides. Au final, ce sont 37 séquences nucléotidiques qui ont été alignées, dont 14 isolats malgaches.

Les séquences nucléotidiques de 10 isolats viraux de Madagascar, à savoir Tsididy08, Ankavandra08, Ambositra09, Namahora09, Ambalanomby09, Morondava09, Fierenana09, Ampasambazimba09, Antsimondrano10, Avaradrano10 sont identiques entre elles. En revanche, des substitutions ont été constatées entre les séquences des isolats Ambatondrazaka09 (T¹²² en C), Ambamala10 (A¹⁴⁴ en G), Masindray10 (T²²⁶ en C et T²⁶⁷ en C) et Gara08 (G⁵⁴⁷ en A). Parmi ces 5 substitutions, toutes des transitions, 3 sont non-synonymes et 2 sont synonymes. Les isolats malgaches montrent donc une homologie de 99,10% à 100% au niveau nucléotidique et de 98,38% à 100% au niveau peptidique.

L'alignement des isolats malgaches avec les souches ouest africaines et européennes a montré 21 substitutions nucléotidiques touchant 9 codons pour le groupe européen et conduisant à 6% de modification de l'acide aminé correspondant.

Les souches sud- et est-africaines sont par contre plus hétérogènes entre elles. Leur comparaison avec les souches malgaches montre 55 variations nucléotidiques positionnées sur 25 codons. Parmi elles, 14,28% conduisent à une modification de l'acide aminé traduit. Cependant, l'ajout de la souche Malawi Lil20/1 à l'alignement montre alors 83 variations nucléotidiques et 44 modifications d'acides aminés sur les 175 que compte le fragment étudié, soit 25,14%. Sur ces 83 mutations, 23 sont des transversions et 60 des transitions.

L'arbre construit à partir de ces séquences nucléotidiques distingue 4 groupes (Figure 24). Le premier est constitué d'isolats du génotype I, le second d'isolats malgaches et de la souche circulant en Europe de l'est et du nord, c'est-à-dire le génotype II, les groupes 3 et 4 étant composés de souches circulant en Afrique de l'est et du sud.

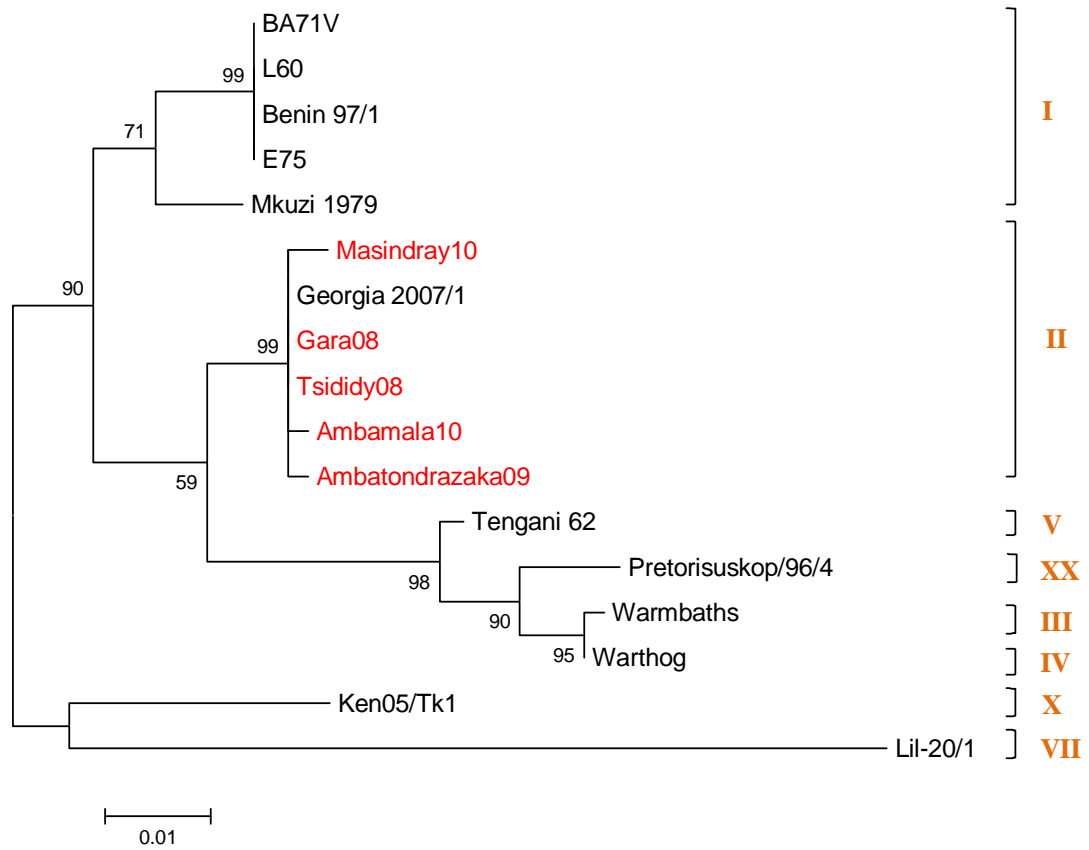


Figure 25 : Arbre phylogénétique (Maximum de vraisemblance) enraciné donnant les relations entre les gènes KP177R (p22) du virus PPA en provenance de Madagascar comparé avec ceux des banques d'Afrique et d'Europe. Les valeurs des bootstraps >50% figurées en face du nœud correspondant ont été calculées après 1000 répétitions. L'échelle indique l'éloignement des isolats dans la matrice de distance. Les souches malgaches de cette étude sont colorées en rouge

4.3. Analyse du gène CP204L

L'amplification du fragment de gène codant pour la protéine p30/32 a généré un fragment de 743 pb, soit le cadre de lecture complet du gène. Les alignements multiples des séquences nucléotidiques ont été effectués par la suite et ont porté sur des séquences de 585 à 615 pb selon les souches. Les séquences peptidiques déduites ont donc une taille comprise entre 195 et 205 acides aminés.

Parmi les 61 séquences nucléotidiques alignées, les séquences de 7 nouveaux isolats malgaches (Gara08, Tsididy08, Antsirabe09, Ambositra09, Fianarantsoa09, Ambamala10 et Talatavolonondry10) ont été générées au cours de cette étude. Les autres séquences proviennent du site public Genbank.

L'alignement des séquences de 6 des nouvelles souches malgaches générées montre une variation portant sur seulement 5 nucléotides et se traduisant par le changement de 3 acides aminés. La souche Fianarantsoa09 montre quant à elle davantage de variation avec 20 substitutions nucléotidiques supplémentaires. Lorsque ces nouvelles séquences et les plus anciennes sont comparées, 35 substitutions nucléotidiques pour 22 acides aminés sont constatées. Ces 35 sites de polymorphismes correspondent à 17 transitions et 18 transversions qui donnent lieu à 27 substitutions non-synonymes et 8 synonymes dans la protéine traduite, soit une homologie de 99,4% à 100% pour les séquences nucléotidiques et de 98,4 à 100% pour les protéines traduites.

La comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques des isolats malgaches avec celles des isolats ouest africains et européens a montré respectivement des substitutions portant sur 51 sites nucléotidiques correspondant à 26 acides aminés et entraînant la modification de 13,8% d'entre eux. Les souches appartenant aux génotypes IX et X (Ken08WH/5, Ken05/Tk1 et Ken50) ont montré davantage de diversité, avec 90 substitutions nucléotidiques, dont 36 transversions et 54 transitions. Si 28 d'entre elles sont synonymes, 41 induisent un changement de l'acide aminé traduit sur les 195 que compte la séquence, soit une variation de 15,4% sur le plan nucléotidique et de 21% sur le plan protéique.

Dans l'arbre phylogénétique déduit, les isolats malgaches se placent au sein du génotype II composé d'autres souches virales provenant de l'est de l'Afrique, principalement du Mozambique, et d'Europe de l'est. Si les génotypes I et II montrent

peu de diversité, les autres clades, sont plus hétérogènes, et correspondent à des isolats est- et sud-africains où a lieu le cycle selvatique du virus.

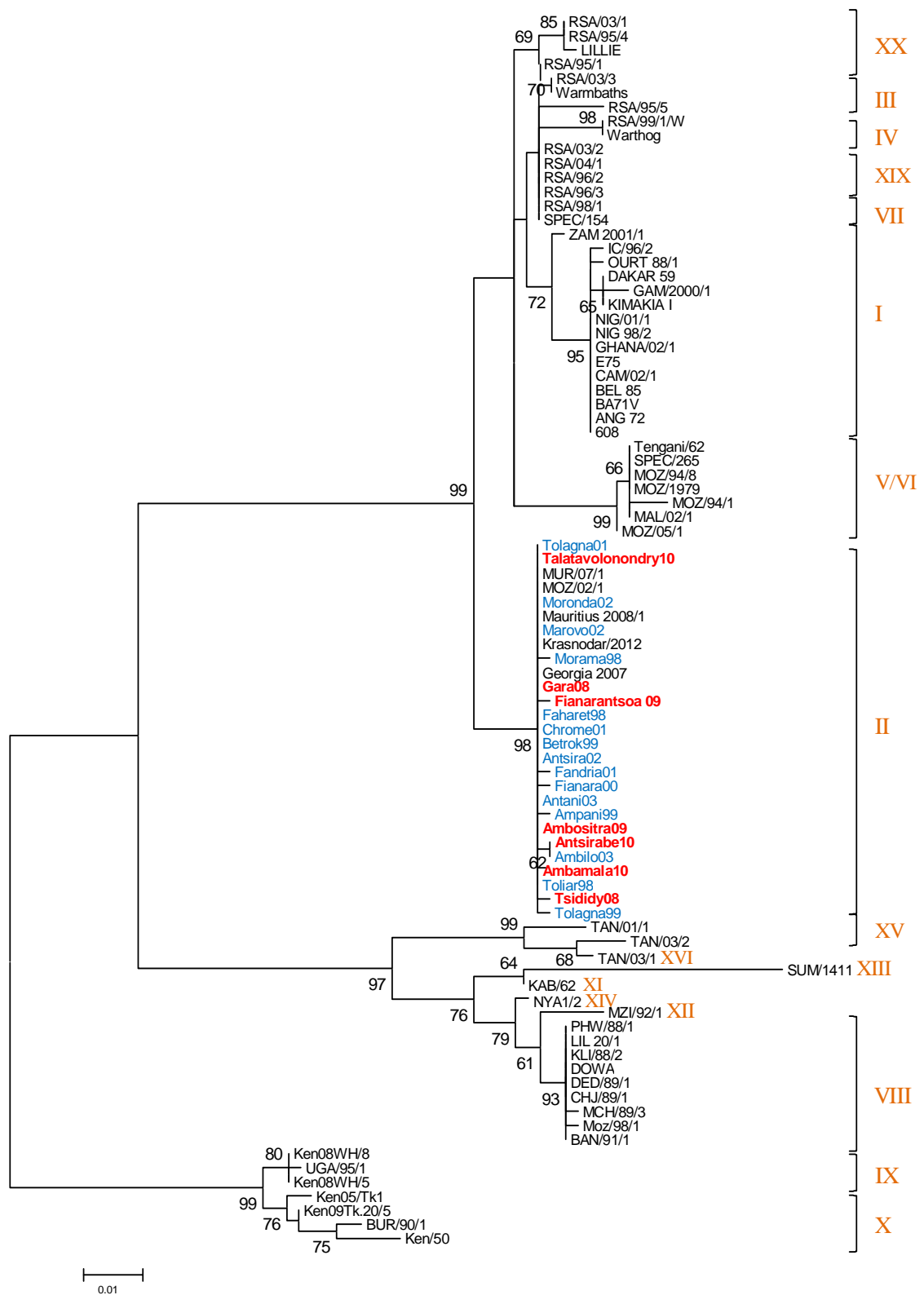


Figure 26 : Arbre phylogénétique (Maximum de vraisemblance) enraciné montrant les relations entre les gènes CP204L (p30) du virus PPA montrant les souches malgaches au sein des 22 génotypes en provenance d'Afrique et d'Europe. Les valeurs des bootstraps >50% figurées en face du nœud correspondant ont été calculées après 1000 répétitions. L'échelle indique l'éloignement des isolats dans la matrice de distance. Les souches malgaches sont colorées en rouge (cette étude) et bleue (avant cette étude).

Chapitre IV

DISCUSSION

1. Validation des techniques de détection de la PPA en utilisant le papier buvard Whatman 3MM

Le virus de la peste porcine africaine est responsable d'une maladie très grave et engendre une perte considérable aux éleveurs et aux pays qu'elle infecte. Par ailleurs, il n'existe pas de vaccin ni de traitement contre cette maladie. La PPA est alors contrôlée par des mesures de biosécurité basées sur l'épidémiologie pour gérer le risque d'introduction et de dissémination de la maladie. Cette mesure est coûteuse et peut nuire au programme de contrôle et d'éradication de la peste porcine africaine surtout dans des pays en voie de développement.

Dans ce contexte, l'utilisation d'un outil de diagnostic efficace et peu coûteux est essentielle. L'emploi du papier buvard Whatman 3MM est l'un des outils avancé dans cette étude.

Le papier buvard imbibé de sang peut être très intéressant pour prélever et conserver des matières biologiques lorsque l'accès à la chaîne de froid est difficile surtout en Afrique où les conditions climatiques ne sont pas maîtrisables (Michaud *et al.*, 2007). Récemment, cette méthode a été appliquée pour diagnostiquer plusieurs maladies (Pitcovski *et al.*, 1999; Vilcek *et al.*, 2001; Uttenthal *et al.*, 2013). Elle est aussi décrite comme une alternative possible pour stocker un échantillon humain et animal pour une étude sérologique (Behets *et al.*, 1992; De Swart *et al.*, 2001; Helfand *et al.*, 2001; Riddell *et al.*, 2003; Johannessen *et al.*, 2009; Joseph and Melrose, 2010). Cette méthode a trouvé aussi un succès lors des conservations des matériels biologiques suivies par la détection des acides nucléiques par PCR (Steiger *et al.*, 1992; De Swart *et al.*, 2001; Abdelwhab *et al.*, 2011). Tout récemment, le papier buvard a été utilisé pour un isolement viral (Abdelwhab *et al.*, 2011). Durant ces études, deux types de papier filtre ont été utilisés. L'une a été conçue spécialement pour la préparation et la préservation des acides nucléiques : ce papier buvard contient des matrices qui aident à lyser les cellules, à dénaturer les protéines et à protéger les acides nucléiques par les nucléases. Le papier Whatman FTA card est classé parmi cette catégorie de papier buvard. Lors de son utilisation, une extraction d'ADN est nécessaire avant de poursuivre l'amplification génique afin de détecter la maladie. Contrairement à cela, d'autres papiers buvards comme le papier Whatman 3MM ne contiennent pas d'additifs mais peuvent conserver l'état

infectieux des virus. Un autre avantage de cette catégorie de papier buvard est qu'il ne contient pas d'inhibiteurs de PCR, ainsi on peut les utiliser sans passer par des étapes d'extraction comme l'a démontré Michaud *et al.*, (2007).

Basée sur ces informations, cette étude a été élaborée en utilisant le papier buvard Whatman 3MM pour évaluer sa performance de détection, de diagnostic et de conservation du virus de la peste porcine africaine.

La détection de la PPA a été réalisée en utilisant d'une part la technique sérologique (ELISA anticorps directe) pour la détection d'anticorps. D'ailleurs, la recherche des anticorps anti-PPA est recommandée dans des formes subaiguës et chroniques et aussi particulièrement appropriée pour le suivi des programmes d'éradication de la maladie (Sanchez-Vizcaino *et al.*, 1998).

Des techniques virologiques (PCR et isolement viral) pour détecter la présence de virus PPA sur le papier buvard Whatman 3MM ont été standardisées. Ces techniques d'analyses sont fréquemment utilisées pour des matériels biologiques standards.

De plus, des comparaisons des techniques de détection de la présence de virus ont été appréciées afin d'évaluer l'efficacité du papier buvard utilisé.

Tout d'abord, une évaluation du papier buvard 3MM comme support de prélèvement afin de diagnostiquer la PPA a été effectuée. Le papier buvard a été imbibé avec du sang de porc puis séché à température ambiante. Une fois séché, le papier buvard est prêt à être utilisé pour plusieurs types d'analyse.

Dans cette étude, les performances des papiers filtres Whatman 3MM pour la collecte et le stockage des échantillons de sang pendant de longues périodes à température ambiante ($> 22^{\circ}\text{C}$) ont été étudiées sur des procédures de diagnostic standard de la peste porcine africaine. Les virus de la PPA collectés sur papier buvard Whatman 3MM dans des abattoirs de Madagascar ont été stockés à température ambiante ($22 - 25^{\circ}\text{C}$) pendant 9 mois sans trop de diminution de sensibilité. Les échantillons positifs sont restés positifs lors des analyses par PCR conventionnelle directe, PCR temps réel de King et UPL après 9 mois de stockage.

Par ailleurs, des essais de stabilité des virus collectés sur papier 3MM ont été effectués en les stockant à +4°C et à 37°C pendant 2 mois. Testés une fois par mois, les virus ont été détectés positifs sur UPL PCR temps réel. Il se peut que la haute température de conservation (37°C) n'a pas agi sur le virus stocké sur le papier buvard (Michaud *et al.*, 2007; Uttenthal *et al.*, 2013).

Ensuite, nous avons effectué une mise au point en étudiant l'influence de la taille des fragments de papier buvard utilisé. 0,3 à 6,25 mm² de papier filtre imbibé de sang ont été utilisés directement dans un tube PCR sans extraction d'ADN. Le virus PPA a été détecté et le papier buvard Whatman 3MM est sensible jusqu'à 5mm² et 6,25 mm² respectivement par PCR conventionnelle et UPL PCR temps réel. Pour la suite des analyses PCR, une taille de 2mm² de papier buvard Whatman 3MM a été adoptée.

Une comparaison de détection de la PPA par PCR conventionnelle dans du sang (Figure 19) et sur du papier filtre Whatman 3MM (Figure 20) a donné les mêmes résultats. Lors de la mise au point du test, les tests PCR conventionnelle directe et UPL ainsi que l'isolement viral ont été comparés. La limite de détection de la PPA sur papier buvard a été effectuée en utilisant une dilution de la souche qui nous a montré un résultat semblable. Par contre, une diminution de un log a été recensée lors de la comparaison des résultats sur papier buvard avec du sang correspondant. Cette diminution de sensibilité a été retrouvée par Braae *et al* (2013).

Dans tous les cas, une spécificité très élevée a été observée avec les différents tests moléculaires évalués dans cette étude. En revanche, les sensibilités étaient plus variables. Ainsi, la première technique PCR en temps réel (King *et al.*, 2003) mise en pratique pour la détection du virus de la PPA était moins sensible que les autres tests moléculaires avec une sensibilité de test de 65,2% [IC₉₅ : 53,7–76,7%], ce qui indique que tout test PCR développé pour les matériaux biologiques conventionnels devrait être évalué à plusieurs reprises avant de passer par une utilisation de routine.

Cependant, l'ADN viral a été détecté facilement en utilisant l'UPL PCR directe en temps réel sur des papiers filtres Whatman 3MM donnant une sensibilité de 95,7% [IC₉₅ : 90,8–100%].

La comparaison des deux techniques PCR temps réel King et UPL a été effectuée. La procédure UPL la plus récente a été nettement plus sensible que le test de référence conçu par King *et al* (2003) (Fernandez- Pinero *et al.*, 2012). Cette différence n'a pas été seulement observée sur les papiers filtres mais aussi sur des organes ou des sangs correspondants. La sonde UPL est une sonde universelle commerciale associée à une amorce spécifique pour amplifier un fragment d'ADN codant pour la protéine VP72. Cette méthode pourrait être utilisée pour détecter différents génotypes de la PPA comme celle effectuée par Braae *et al* en 2013.

L'UPL PCR (Fernandez *et al.*, 2012) est moins chère que la méthode Taqman (King *et al.*, 2003), alors assemblée avec la détection directe sur papier filtre, cette technique est probablement plus adaptée aux laboratoires avec un budget réduit. Le papier Whatman 3MM n'est pas seulement moins cher, mais aussi pratique pour la surveillance à grande échelle dans les zones rurales et reculées tropicales.

La sensibilité des méthodes UPL PCR en temps réel est la même que celle de l'isolement viral. Par ailleurs, la technique de l'isolement viral est lourde et demande beaucoup de temps avant d'avoir un résultat. En effet, comme l'ont déjà décrit Risatti *et al.*, (2005), la PCR est meilleure que l'isolement viral pour déceler la présence de virus dans un élevage aux Caraïbes. Alors, pour la suite de cette étude, l'utilisation de la technique UPL PCR que King PCR ou l'isolement viral a été décidée.

Avec cette méthode, l'ADN viral collecté sur papier buvard Whatman 3MM pendant les études expérimentales a été détecté très précocement de 1 à 3 jours après inoculation. La possibilité de faire la recherche de génome à partir de sang collecté sur papier buvard Whatman 3MM permet d'obtenir un résultat rapidement sans être obligé d'abattre des animaux pour faire l'analyse. En disposant d'un outil de diagnostic aussi performant que la PCR temps réel, seuls les élevages reconnus infectés pourraient être éliminés, épargnant ainsi les élevages sous surveillance mais non infectés. L'utilisation de cette méthode de détection dans le cadre de toute suspicion de peste porcine sur des lésions vues à l'abattoir comme lors de suspicion clinique en élevage est envisagée.

Une des originalités de cette étude est la détection des anticorps anti-PPA sur des papiers buvards imbibés de sang de porc testés avec un coffret commercial ELISA. Pour les porcs, l'anticorps est très important puisqu'il confère une protection qui va réduire les virémies entraînant le recul de l'arrivée des signes cliniques et empêchant une infection par un autre virus (Onisk *et al.*, 1994).

Cette méthode a été conçue habituellement pour des analyses des sérums afin de rechercher la présence des anticorps anti-PPA. Pour cette étude, 40mm² de papier buvard Whatman 3MM ont été utilisés dans l'analyse sérologique (Hutet *et al.*, 2003; Joseph and Melrose, 2010; Curry *et al.*, 2011). Quelques microlitres de sang suffisent pour faire plusieurs tests.

La facilité d'obtention des prélèvements et la rapidité de mise en œuvre du test permettent de réaliser plus d'analyses pour les élevages et d'obtenir ainsi des résultats d'autant plus fiables. Cette technique facilite la surveillance et le contrôle de la PPA sur terrain. La difficulté rencontrée lors des collectes, le stockage et le transport des prélèvements du terrain au laboratoire pourrait être éliminée. Le papier buvard imbibé de sang élimine la réfrigération et la centrifugation des prélèvements.

Les résultats sont très prometteurs lors des comparaisons de l'utilisation de papier filtre 3MM avec celle du sérum correspondant. Lors des études expérimentales, la prévalence par ce test est très semblable à celle de la technique ELISA conventionnelle (32,6% contre 34,8%). Cette étude effectuée sur 46 prélèvements nous a montré une sensibilité de 93.8% [IC₉₅ : 71,7–98,9%] et une spécificité de 100% [IC₉₅ : 88,6–100].

Les résultats obtenus par la détection d'anticorps anti-PPA utilisant les papiers buvards Whatman 3MM sont très fiables dans le sens où seul un échantillon positif n'est décelé et qu'aucun faux positif n'est détecté (valeur prédictive positive à 100%).

La capacité de cette technique de diagnostic est particulièrement importante pour les programmes d'éradication dans les pays en développement, où les résultats positivement faux sont fréquents en raison des conditions déficientes de transport et de stockage des sérums, l'une des raisons les plus courantes pour des résultats non spécifiques dans l'ELISA (Escribano *et al.*, 1989). En outre, une détection précise des animaux séronégatifs est essentielle pour la réduction de l'abattage dans la

population sensible, en particulier dans les régions économiquement défavorisées, où les animaux individuels ont des valeurs relativement élevées.

Nos résultats montrent aussi qu'une concentration d'anticorps collecté sur papier 3MM peut être inférieure à celle comparée au sérum correspondant. Nos résultats suggèrent que les papiers filtres peuvent être utilisés pour la détection des anticorps par la technique ELISA comme l'ont montré d'autres études auparavant pour d'autres maladies et d'autres espèces animales (Hutet *et al.*, 2003, Joseph *et al.*, 2010, Curry *et al.*, 2011).

En revanche, l'utilisation des papiers filtres au lieu des sérums pour le test sérologique est moins pratique et présente une limite (de Swart *et al.*, 2001) au niveau du laboratoire. En effet, les papiers filtres stockés à température ambiante doivent être élués pendant quelques minutes ou quelques heures avec agitation dans le tampon approprié pour permettre la récupération des anticorps. Néanmoins, une légère diminution de la sensibilité a été observée lors d'une comparaison entre sérum et papier buvard 3MM. Par contre, les sérums et les papiers filtres pour le test ELISA s'accordent parfaitement (Kappa de 0,95) malgré une petite réduction de sensibilité de ce test.

Cette diminution de la sensibilité peut être simplement compensée dans les programmes de sérosurveillance par une augmentation du nombre des échantillons cibles sur le terrain. Entre autres, la procédure de collecte de sang sur le papier Whatman 3MM est facile (gouttelettes de sang par scarification de la peau de l'oreille), la diminution de sensibilité de cette procédure ne devrait pas être un problème majeur compte tenu de l'avantage des papiers filtres pour stocker à long terme du matériel biologique à température ambiante.

Heureusement, cet inconvénient ne se pose pas sur les techniques moléculaires qui, après les tests sérologiques, sont les procédures de diagnostic les plus utilisées pour l'identification rapide des maladies animales et humaines.

Pendant la période où la Côte d'Ivoire est indemne de la PPA, des prélèvements de porc collectés en 2009 et 2010 ont été parvenus pour étoffer cette étude. Les 346 papiers buvards 3MM collectés en Côte d'Ivoire ont tous été négatifs sur UPL PCR. Ce résultat nous donne une spécificité de cette étude de 100% sur l'utilisation du papier buvard Whatman 3MM.

Il est montré dans cette étude que les papiers filtres Whatman 3MM tiennent un avantage remarquable par rapport aux matériaux biologiques conventionnels (Sang, organes, sérum...) parce que l'extraction des acides nucléiques n'est pas nécessaire. De ce fait, la possibilité d'effectuer la PCR conventionnelle et la PCR en temps réel directe permet une réduction intéressante du coût et du temps pour le diagnostic moléculaire de la peste porcine africaine. De plus, un autre avantage de l'utilisation du papier filtre est aussi la possibilité de réduire les contaminations pendant les collectes de prélèvement.

Cette étude présente le développement, la standardisation et la validation de l'utilisation des papiers buvards Whatman 3MM comme outils de détection de la peste porcine africaine.

Lors de la détection et la validation des techniques de diagnostic, des comparaisons ont été faites et l'utilisation des papiers buvards a montré un bon accord avec les prélèvements standards. La valeur du test kappa k est considérée comme bonne si K est supérieur à 0,81. Le seul considéré comme mauvais accord a été trouvé avec l'utilisation du PCR temps réel taqman que l'on pourrait écarter des tests à l'avenir.

2. La peste porcine africaine et la circulation virale à Madagascar

Sur le terrain, le virus de la PPA est une vraie menace pour l'élevage de porc domestique dans le monde. Elle touche les porcs de tout âge, de toute race et engendre une perte financière considérable. Hautement contagieuse pour les suidés mais non transmissible à l'homme, cette maladie est une des préoccupations majeures des éleveurs de porc à Madagascar.

Dans le cadre du présent travail, la séroprévalence instantanée de 0,2% a été enregistrée, témoignant la circulation à bas bruit de la PPA à Madagascar. Ce résultat reflète ce qui a été recensé lors des analyses sérologiques effectuées au début de la PPA dans l'île : 2,3% [IC₉₅ : 1,35% à 3,25%] en 1999, moins de 0,6% en 2000 et 0,63% en 2001 (Rousset *et al.*, 2001).

Les enquêtes virologiques au même titre que les enquêtes sérologiques ont montré que les virus de la PPA circulent dans tous les compartiments étudiés à

Madagascar. La prévalence virologique de 17,8% [IC₉₅ : 10,26% à 25,66%] effectuée par PCR conventionnelle est enregistrée et confirme la circulation de virus de la peste porcine africaine dans toutes les régions visitées déjà mise en évidence dans l'enquête sérologique. De plus, la pratique de l'abattage clandestin, la distribution de la viande malade entraînent une diffusion du virus de la PPA.

Cette viroprévalence est proche de celle de 14% [IC₉₅ : 7,06% à 20,93%] enregistrée dans l'étude effectuée à Ambatondrazaka cinq ans auparavant (Randriamparany T *et al.*, 2005).

3. Caractérisation moléculaire des virus malgaches

Les modes de propagation du virus PPA sont multiples. Un porc domestique peut en effet être infecté par contact avec un animal malade, piqûre d'une tique molle infectieuse, contact avec du matériel souillé ou encore ingestion de nourriture contaminée. Pour comprendre la circulation des virus, il est donc fondamental de pouvoir tracer leur origine, c'est-à-dire d'être à même de déterminer la provenance d'un foyer dans une zone donnée. Là encore, les réticences des éleveurs ne permettent pas toujours d'obtenir toutes les informations nécessaires à cette traçabilité. Dans ce contexte particulier, les analyses phylogénétiques, qui permettent de caractériser au niveau moléculaire les isolats viraux et de comprendre les liens qui les unissent, peuvent être d'une très grande utilité.

Sur un plan historique, il est vraisemblable que l'épidémie de PPA à Madagascar ait fait suite à l'unique introduction en 1998 d'une souche mozambicaine dans le sud de l'île, à Taolagnaro (Gonzague *et al.*, 2001). Avant cette date, l'île était indemne de PPA, hypothèse corroborée par des études sérologiques rétrospectives qui se sont avérées négatives (Gonzague *et al.*, 2001). Le virus PPA ne présentant pas de sérotype, une discrimination spatio-temporelle des isolats n'a pas pu être réalisée d'un point de vue antigénique (Whyard *et al.*, 1985). Depuis lors, de nombreuses méthodes d'analyse phylogénétique ont été développées, utilisant les séquences nucléotidiques, ce qui a permis d'établir la circulation de 22 génotypes, suivant l'analyse du gène de capsid B646L (Bastos *et al.*, 2003 ; Lubisi *et al.*, 2005 ; Boshoff *et al.*, 2007). Parmi ces génotypes, certains sont nationaux, c'est-à-dire étroitement liés à un territoire donné, tandis que d'autres sont transnationaux.

L'analyse de ce gène a cependant permis de dégager quatre grands génogroupes correspondant peu ou prou à une dichotomie au niveau régional, avec une circulation de 21 des 22 génotypes en Afrique de l'est et du sud (le génotype I regroupant quant à lui des isolats ouest africains, européens, caribéens et sud-américains). D'autres gènes ou fragments de gènes ont depuis été étudiés avec l'objectif d'obtenir une discrimination plus fine, au niveau local : B602L (codant pour une protéine kinase), E183L et CP204L (codant respectivement pour les protéines d'enveloppe p54 et p30/32). Parmi ces gènes, seul le gène E183L a montré un potentiel discriminant concernant des isolats sardes.

En ce qui concerne notre étude, nous avons focalisé nos analyses sur les gènes B646L, CP204L et KP177R (codant pour la protéine d'enveloppe p22). Nous n'avons pas retenu le gène E183L car des analyses antérieures avaient montré une variabilité très faible entre isolats malgaches mais nous avons adjoint le gène KP177R qui lui en avait montré (V. Michaud, communication personnelle). Les résultats de l'analyse de ce dernier gène doivent tout de même être pris avec précaution puisqu'il a été montré qu'il pouvait exister des orthologues au sein d'un même génome (Chapman *et al.*, 2008). Quoiqu'il en soit, les trois protéines exprimées par ces gènes induisent des anticorps spécifiques chez le porc domestique et en étant soumises à la pression du système immunitaire pouvaient dès lors montrer une diversité susceptible de discriminer les isolats.

Au niveau mondial, nos analyses ont montré que quel que soit le gène étudié, les isolats malgaches se plaçaient toujours au sein du génotype II viral. Cependant, la diversité entre les isolats malgaches reste faible sur ces loci malgré plus de 15 ans de circulation du virus dans l'île. En effet, l'analyse du fragment du gène B646L a montré 100% d'homologie entre les isolats et si les gènes CP204L et KP177R ont montré davantage de diversité, avec respectivement 0,6% et 0,9% de différence, aucune filiation spatio-temporelle n'a pu être mise en exergue qui puisse indiquer l'origine de nouveaux foyers ou la réémergence de foyers plus anciens. Cette stabilité peut s'expliquer notamment par le cycle jusqu'ici exclusivement domestique que suit le virus dans l'île. Deux hôtes sauvages sont pourtant présents, à savoir le potamochère et la tique *O. porcinus*, mais si le virus a été détecté chez quelques tiques (Ravomanana *et al.*, 2010), leur très faible répartition sur le territoire induit

qu'elles ne soient vraisemblablement pas à l'origine de foyers et aucun potamochère n'a jusqu'ici été détecté comme porteur. Or, le maximum de diversité est observé chez le virus lorsque le cycle selvatique est présent, à savoir dans l'est et le sud de l'Afrique continentale, le passage d'un hôte à l'autre étant sans doute un « moteur » évolutif. De même, les éleveurs éliminent souvent très rapidement les animaux qui leur semblent malades, ce qui ne permet sans doute pas au virus de se répliquer suffisamment pour induire une diversification. Cependant, nos analyses ont porté sur une fraction très courte du génome viral. Des analyses portant sur des portions plus larges, voire sur des génomes entiers pourraient permettre de déterminer des loci spécifiques de la diversification à partir d'une population virale relativement homogène puisque descendante d'un unique parent.

4. Epidémiologie

Sur le terrain, la PPA touche les porcs de tout âge et de toute race, engendrant des pertes financières considérables. Elle constitue ainsi la préoccupation majeure des éleveurs en étant une des plus grandes contraintes à l'expansion de la filière porcine dans l'île (Randriamparany *et al.*, 2005). En effet, en 2004 par exemple, la maladie était suspectée sur les 14% [IC₉₅: 7,06% à 20,93%] des porcs amenés à l'abattoir d'Ambatondrazaka. Par ailleurs, une étude ultérieure réalisée en 2006 dans trois régions productrices de porc à Madagascar a révélé que 33% [IC₉₅ : 23,59% à 42,40%] des éleveurs enquêtés avaient déjà suspecté la PPA dans leurs élevages (Costard *et al.*, 2009) au cours des années précédentes.

Au cours de notre étude, nous avons déterminé une séroprévalence instantanée de 0,2%, ce qui témoigne d'une circulation à bas bruit de la PPA à Madagascar. Ce résultat corrobore des analyses sérologiques antérieures réalisées dès l'apparition de la PPA dans l'île. En 1999, la séroprévalence avait été estimée à 2,3% [IC₉₅ : 1,35% à 3,25%], ce qui correspondait à une expansion de la maladie suivant son émergence. Suite à la très forte mortalité qui a eu lieu durant la phase épidémique de PPA au cours des deux premières années de l'épidémie, cette séroprévalence chutait dès 2000 pour atteindre moins de 0,6%, puis 0,63% en 2001 (Rousset *et al.*, 2001). Si les politiques sanitaires mises en place ne sont pas parvenues à l'éradiquer, tout du moins elles semblent avoir réussi à contenir la maladie puisque plus de dix ans plus tard, la séroprévalence a encore diminué dans

l'île. Cette séroprévalence « résiduelle » pourrait être le signe de la circulation des souches virales de moindre virulence puisque les animaux sont séroconvertis.

En revanche, si les enquêtes virologiques ont montré au même titre que les enquêtes sérologiques que le virus PPA circulait dans toutes les régions malgaches étudiées, la prévalence virologique est nettement supérieure. En effet, l'amplification génique du gène B646L a permis de détecter l'ADN viral dans 17,8% [IC₉₅ : 10,26% à 25,66%] des cas. Ceci confirme une circulation du virus en augmentation par rapport à une étude réalisée en 2004 qui l'avait estimée à 14% [IC₉₅ : 7,06% à 20,93%] (Randriamparany *et al.*, 2005) et plus importante que ne le laisserait entrevoir le résultat des analyses sérologiques. Un tel niveau de circulation virale parmi les animaux rend très problématique l'abattage clandestin et la distribution de viande potentiellement contaminée, ces pratiques permettent une diffusion ininterrompue du virus sur l'ensemble du territoire.

Ces pratiques illégales ne semblent hélas pas pouvoir être en passe d'être abolies. Dès la confirmation officielle de l'émergence de la maladie en 1998, des mesures gouvernementales ont été instaurées (Arrêté Interministériel du 13 janvier 1999) : des barrages sanitaires et une politique d'abattage ont été mis en œuvre pour tenter d'endiguer sa progression. Des campagnes d'information et de sensibilisation ont été réalisées (Roger *et al.*, 1999) et un réseau d'épidémiosurveillance mis en place en 1999 dans le cadre d'un Projet de Coopération Technique financé par la FAO (Blanchard, 2001). Cependant, ces mesures n'ont pas été suffisamment appliquées faute de moyens financiers, notamment la pratique d'abattage systématique, qui n'a pas pu être réellement mise en place. En effet, l'absence de compensation financière pour leurs pertes a conduit à une grande réticence voire au refus des éleveurs de déclarer la présence des porcs malades dans leurs élevages, encourageant de fait l'abattage clandestin des animaux suspects et contribuant à la désorganisation de l'ensemble de la filière porcine. La maladie s'est donc propagée à l'ensemble de l'île et continue aujourd'hui à y faire des ravages sans que les autorités n'aient pu être à même de la stopper.

Après les vagues épizootiques de la maladie en 1998 – 99, la PPA évolue vers l'état endémique et la mortalité diminue mais elle conserve son caractère meurtrier. Cette situation de forme enzootique a été retrouvée avec une diminution importante

des cas en Espagne, au Portugal, au Brésil en Haïti, au Cameroun et dans la plupart des pays africains (Saliki *et al.*, 1985). Le calme revient, peu d'informations parviennent aux services vétérinaires malgaches quant à l'incidence de la PPA.

Les petits éleveurs sont de plus en plus nombreux et la crise survenue dans le monde a aussi un impact sur le mode d'élevage de porc. L'utilisation des eaux grasses pour l'alimentation des porcs devient une pratique pour alléger les coûts de l'alimentation. Cette pratique est alors la probable source de contamination des porcs à Madagascar en 1997 (Gonzague *et al.*, 2001) et l'est en Géorgie en 2007 (Rowland *et al.*, 2008).

Madagascar est un pays endémique de la PPA et des cas sporadiques sont rapportés avec une viroprévalence de 17%. Par contre, la séroprévalence est très faible voire nulle pendant les campagnes de collecte des prélèvements. Cette situation existait depuis que la PPA est survenue à Madagascar et suggère quelques hypothèses, soit la souche virale est virulente et l'animal n'a pas le temps de produire des anticorps, soit le porc est abattu ou vendu par l'éleveur dès qu'il y a des signes évocateurs de la maladie (Randriamparany *et al.*, 2005). Pourtant, une enquête effectuée dans la zone rurale de Marovoay (Humbert., 2006) et de Talatavolonondry (Communication personnelle, 2008), montre que dans la majorité des cas, les éleveurs abattent les porcs malades et la viande est soit vendue sur le marché, soit consommée dans le cercle familial. Cette pratique est généralisée par la majorité des éleveurs à Madagascar et seule une minorité déclare et enterre les cadavres d'animaux morts de la maladie (Humbert C., 2006). Cette situation donne un impact dans la détection de la prévalence lors des études et surtout favorise la dissémination de la maladie.

En outre, les tiques molles et les potamochères qui sont des hôtes sauvages du virus de la PPA (Sanchez-Botija, 1963 ; Thomson, 1985) existent à Madagascar (Lamoureux, 1913; Andrianjakarivelo, 2003). Une récente étude nous a montré la présence des tiques molles infectées *O. porcinus domesticus* à Madagascar qui est un danger potentiel pour les élevages de porc dans un pays endémique de la maladie. Par contre, la grande île ne présentait pas de cycle selvatique mais uniquement un cycle chez le porc domestique et les tiques molles dans les zones où elles sont présentes suggérant que le potamochère joue un rôle négligeable dans

l'épidémiologie de la PPA à Madagascar (Ravaomanana *et al.*, 2010). L'abattage systématique des animaux infectés ainsi que l'abattage de tous les porcs dans un rayon de 10 km est nécessaire pour contrôler la maladie. Malheureusement, tous ces problèmes sont ajoutés à l'inaptitude du pays à éliminer le virus par manque de budget pour dédommager les éleveurs.

Alors l'utilisation de papier buvard Whatman 3MM est l'un des outils des laboratoires et des pays tropicaux pour détecter très précocement la PPA. Il a été adopté pour détecter le virus PPA sur terrain c'est-à-dire dans les élevages et au niveau des abattoirs. Par la suite, le papier buvard imbibé de sang est un support pas cher, simple et rapide pour la collecte de sang, la préservation et le diagnostic de la maladie de la PPA en utilisant l'ELISA, les PCR directes conventionnelles et les PCR en temps réel et l'isolement du virus. D'autres avantages du papier filtre 3MM comprennent le plus petit volume de sang requis et la capacité de recueillir un grand nombre d'échantillon (Dubay *et al.*, 2006).

L'étude phylogénétique confirme que les souches du virus PPA collectées à Madagascar durant cette étude appartiennent au génotype II. L'alignement des séquences des gènes B646L codant des protéines des souches malgaches montre une homologie de 100% suggérant une source unique de contamination. En revanche, les gènes KP177R et CP204L sont plus diversifiés.

Par contre, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour établir la robustesse de l'essai de collecte d'échantillon à grande échelle dans un pays endémique. Les papiers filtres Whatman 3MM utilisés dans cette étude sont moins coûteux. Les papiers filtres Whatman 3MM peuvent donc être utilisés comme support pour le diagnostic multivalent dans des conditions tropicales.

Chapitre V

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis d'évaluer la capacité du papier buvard Whatman 3MM à stocker et à transporter le virus de la PPA. Cette étude a montré que ce papier permet une technique de diagnostic simple, économique, moins cher et répondant au besoin des pays tropicaux sur la résolution de l'utilisation de chaîne de froid.

Ce travail a présenté l'efficacité du papier buvard Whatman 3MM pour la détection précoce du virus de la PPA par la PCR conventionnelle, les PCR à temps réel (Taqman, et UPL) et l'isolement viral. Les virus PPA par utilisation de papier buvard 3MM ont été détectés très précocement à 1-3 jour après infection. Un des résultats de cette étude est l'aptitude du papier Whatman 3MM à détecter aussi l'anticorps anti-PPA avec une sensibilité de 93.8% et une spécificité de 100%.

Le test Kappa réalisé à l'aide des résultats obtenus produit un coefficient entre 0,90 et 0,96, soit une concordance proche de l'absolu avec les différentes méthodes de prélèvement sauf avec la méthode Taqman.

Les papiers buvards ont la performance d'évaluer la prévalence de la peste porcine africaine sur des échantillons collectés en abattoir de Madagascar et prélevés en élevage de Côte d'Ivoire afin d'apprécier le risque représenté par la PPA dans ces régions.

Cette étude nous a permis aussi de mieux connaître les caractéristiques moléculaires des différentes souches collectées de 2008 à 2010 à Madagascar. L'analyse phylogénétique des 18 isolats que nous avons effectué, a été établie sur trois gènes parmi les 160 gènes recensés du virus PPA. L'analyse du gène B646L de nos séquences nous renseigne sa place dans le génotype II des 22 qui existent comme il a été décrit par Bastos *et al.* (2003) et Boshoff *et al.* (2007). Ce gène est stable et 100% homologue avec les souches malgaches depuis 1998. Par contre, les gènes KP177R et CP204L sont très variables entre eux même s'ils sont restés dans le même génotype II. En plus, cette étude est essentielle pour la détermination des sources et l'évolution des isolats viraux à Madagascar.

De nos jours, les gens voyagent beaucoup avec leur animal et leurs produits dérivés sur de longue distance dans une courte durée. Cependant, la mondialisation est une source indirecte de dissémination d'une maladie. Ce mouvement entraîne

l'introduction des agents pathogènes dans des nouveaux territoires. Les petits éleveurs sont de plus en plus nombreux et la crise survenue dans le monde a aussi un impact sur le mode d'élevage de porc. L'utilisation des eaux grasses pour l'alimentation des porcs devient une pratique pour alléger les coûts de l'alimentation. Cette pratique est alors la plus probable source de contamination des porcs à Madagascar en 1997 (Gonzague *et al.*, 2001) et en Géorgie en 2007 (Rowland *et al.*, 2008). Une des difficultés de la lutte contre la PPA est l'existence des modes d'élevage non conformes. A Madagascar, la divagation des porcs est encore pratiquée favorisant le manque de recensement des élevages existant qui entraîne une difficulté et un impact négatif (temps, ressources et équipements...) sur la mesure de contrôle pratiquée. Ce mode d'élevage avec la faible mesure de biosécurité facilitent la dissémination du virus PPA.

La PPA est une contrainte majeure car elle limite le développement de l'élevage porcin. Cette maladie cause un impact sur l'économie d'un pays où elle sévit et dégage ainsi l'existence d'un manque à gagner colossal. Une étude évaluant les impacts économiques des principales maladies porcines (PPA, PPC, Maladie de Teschen, Cysticercose) à Madagascar a révélé une perte directe de 50 925 000 de dollars US et un coût indirect s'élevant jusqu'à 408 000 000 dollars US (Andriamparany, 2012). Madagascar doit poursuivre la lutte contre les maladies porcines. Le papier buvard Whatman 3MM est un outil de collecte, de transport, de détection rapide de la PPA peu coûteux pour réduire les dégâts causés par cette maladie.

En outre, les hôtes sauvages du virus de la PPA (Sanchez-Botija, 1963; Thomson, 1985) à savoir les tiques molles et les potamochères ont été répertoriés à Madagascar (Lamoureux, 1913; Andrianjakarivelo, 2003). En revanche, la grande île ne présentait pas de cycle selvatique et les porcs sauvages ne sont jamais infectés. Cette situation nous fait penser que les potamochères n'ont pas un rôle important dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar (Ravaomanana *et al.*, 2010). Alors, seul le cycle domestique existe, présentant des tiques molles infectées *O. porcinusdomesticus* qui est une menace de contamination non négligeable pour les élevages de porc dans les pays endémiques de la maladie.

En résumé, le papier filtre Whatman 3MM est un support pas cher, simple et rapide pour la collecte de sang, la préservation et le diagnostic de la maladie de la PPA en utilisant l'ELISA, les PCR directes conventionnelles, les PCR en temps réel et l'isolement du virus. D'autres avantages du papier filtre 3MM comprennent le plus petit volume de sang requis et la capacité de recueillir un grand nombre d'échantillons (Dubay *et al*, 2006).

Les papiers filtres Whatman 3MM utilisés dans cette étude sont moins coûteux et peuvent donc être utilisés comme support pour le diagnostic multivalent dans des conditions tropicales. Par contre, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour établir la robustesse de l'essai de collecte d'échantillon à grande échelle dans un pays endémique. Afin de compléter ces études, il serait intéressant (i) de poursuivre les activités de recherche sur la caractérisation moléculaire des souches malgaches, (ii) de continuer la validation de détection d'anticorps collectés sur papier buvard avec plusieurs prélèvements de terrain.

Le ministère de l'élevage et la direction des services vétérinaires (DSV) sont les autorités compétentes en matière de santé animale à Madagascar. Ils devraient informer les éleveurs sur la pratique des mesures de biosécurité, de commencer à avoir une liste des éleveurs pour faciliter le contrôle en cas de maladie. Les autorités compétentes devraient intégrer dans leur plan de contrôle une campagne de conscientisation des éleveurs avant et pendant la période de crise pour une prévention efficace.

Un outil de contrôle et de dépistage de la PPA a été conçu qui est l'utilisation du papier buvard Whatman 3MM, alors les autorités devraient appuyer les laboratoires afin de dépister très précocement les maladies pour pouvoir protéger le cheptel porcin.

Les collecteurs voyagent beaucoup pour rassembler des porcs. Ils s'approvisionnent chez des petits éleveurs un peu partout dans les provinces pour couvrir les besoins de la capitale. Ces dernières années, des cas fréquents d'introduction de porc ont été constatés pour infecter le cheptel des éleveurs. Avant d'introduire des nouveaux porcs dans l'élevage, ils doivent les mettre en quarantaine pour éviter une contamination.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abdelwhab, E.M., Lüscho, D., Harder, T.C., Hafez, H.M., 2011. The use of FTA® filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *J. Virol. Methods.* 174, 120–122.
2. Agüero, M., Fernandez, J., Romero, L.J., Sanchez Mascaraque, C., Belak, S., Arias M. and Sanchez-Vizcaino, J.M., 2003. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever in clinical samples, *Journal of Clinical Microbiology.* 41, 4431–4434
3. Agüero, M., Fernández, J., Romero, L.J., Zamora, M.J., Sánchez, C., Belák, S., Arias, M., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2004. A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet. Res.* 35, 551–563.
4. Alcamí, A., Angulo, A., Lopez-Otin, C., Munoz, M., Freije, J.M., Carrascosa, A.L., Vinuela, E., 1992. Amino acid sequence and structural properties of protein p12, an African swine fever virus attachment protein. *J Virol* 66, 3860-3868.
5. Alejo, A., Andres, G., Salas, M.L., 2003. African swine fever virus proteinase is essential for core maturation and infectivity. *J Virol* 77, 5571-5577.
6. Alfonso, C. L., L. Zsak, C. Carrillo, M. V. Borca, and D. Rock, 1998: African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. *J. Gen. Virol.* 79, 2543–2547.
7. Almazan, F., Rodriguez, J.M., Andres, G., Perez, R., Vinuela, E., Rodriguez, J.F., 1992. Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus. *J Virol* 66, 6655-6667.
8. Almazan, F., Rodriguez, J.M., Angulo, A., Vinuela, E., Rodriguez, J.F., 1993. Transcriptional mapping of a late gene coding for the p12 attachment protein of African swine fever virus. *J Virol* 67, 553-556.
9. Alonso, F., Dominguez, J., Viñuela, E. and Revilla, Y., 1997. African swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the 32 kDa immediate early protein (vp32). *Virus. Res.* 49, 123-130.
10. Alonso, C., Miskin, J., Hernández, B., Fernández-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L. and Escribano, J.M. (2001). African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J. Virol.* 75, 9819-9827.
11. Anderson, E.C., Hutchings, G.H., Mukarati, N., Wilkinson, P.J., 1998. African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Veterinary Microbiology* 62, 1–15.
12. Andres, G., Garcia-Escudero, R., Salas, M.L., Rodriguez, J.M., 2002. Repression of African swine fever virus polyprotein pp220-encoding gene leads to the assembly of icosahedral core-less particles. *J Virol* 76, 2654-2666.
13. Andres, G., Garcia-Escudero, R., Simon-Mateo, C., Vinuela, E., 1998. African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from the endoplasmic reticulum. *J Virol* 72, 8988-9001.
14. Andres, G., Simon-Mateo, C., Vinuela, E., 1997. Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J Virol* 71, 2331-2341.
15. Andriamparany HM. 2012. Evaluation des impacts économiques des maladies porcines importantes à Madagascar. Thèse de doctorat. Antananarivo, Madagascar.
16. Angulo, A., Vinuela, E. Alcamí, A., 1993. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified, recombinant virus attachment protein p12. *Journal of Virology* 67, 5463-5476.

17. Argilaguet JM, Perez-Martin E, Gallardo C, Salguero FJ, Borrego B, et al., 2011. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine* 29: 5379–5385.
18. Arias M, Sanchez-Vizcaino JM., 2002. African swine fever. In: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman JJ, eds. *Trends in emerging viral infections of swine*. AmesIA: Iowa State Press.
19. Ayoade G.O., Adeyemi I.G. African Swine Fever: an Overview *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 2003, 56 (3-4): 129-134.
20. Babalobi, O. O., Olugasa B. O., Oluwayelu D. O., Ijagbone I. F., Ayoade G. O., Agbede S. A., 2007: Analysis and evaluation of mortality losses of the 2001 African swine fever outbreak, Ibadan, Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 39, 533–542.
21. Basto, A.P., Portugal, R.S., Nix, R.J., Cartaxeiro, C., Boinas, F., Dixon, L.K., Leita, A., Martins, C., 2006. Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Arch. Virol.* 151, 819–826.
22. Bastos, A.D., Penright, M.L., Cricière, C., Edrich, J.L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann E.R., Thomson G., 2003. Genotyping field isolates of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol* 148(4):693-706.
23. Behets, F., Kashamuka, M., Pappaioanou, M., Green, T.A., Ryder, R.W., Batter, V., George, J.R., Hannon, W.H., Quinn, T.C., 1992. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1179–1182.
24. Beltran-Alcrudo D, Lubroth J, Depner K, De La Rocque S. African swine fever in the Caucasus. *FAO*; 2008. pp. 1–8 [EMPRES Watch (Internet)] <http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/aj214e/aj214e00.pdf>.
25. Beltran-Alcrudo, D., V. Guberti, L. de Simone, J. de Castro, A. Rozstalnyy, K. Dietze, S. Wainwright, and J. Slingerbergh, 2009: African Swine Fever Spread in the Russian Federation and the Risk for the Region. *EMPRES watch*, FAO, Rome.
26. Benedict, C.A., Norris, P.S., Ware, C.F., 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* 3, 1013-1018.
27. Bengis, R.G., Veary, C.M., 1997. Public health risks associated with the utilisation of wildlife products in certain regions of Africa. *Rev Sci Tech* 16, 586-593.
28. Blome, S., Gabriel, C., Dietze, K., Breithaupt, A., Beer, M., 2012. High virulence of African swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerging Infectious Diseases* 18 (4), 708.
29. Boinas FS., 1995. Epidemiological characterization of the role of *Ornithodoros erraticus* as a reservoir of African swine fever in Portugal. *Veterinaria Technica* 5: 30–36.
30. Boinas F.S, Hutchings G.H, Dixon L.K, Wilkinson P.J. 2004. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol*; 85:2177–87.

31. Boinas, F. S., A. J. Wilson, G. H. Hutchings, C. Martins, and L. K. Dixon., 2011: The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. PLoS ONE 6,e20383.
32. Bool, P.H., Ordas, A., Sanchez Botija, C, 1969. The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence. Bul Off Int Epizoot 72:819-839.
33. Borca, M.V., Irusta, P., Carrillo, C., Afonso, C.L., Burrage, T., Rock, D.L., 1994. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope. Virology 201, 413-418.
34. Borca, M.V., Carrillo, C., Zsak, L., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Neilan, J.G., Burrage, T.G., Rock, D.L., 1998. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. J Virol 72, 2881-2889.
35. Boshoff, C.I, Bastos, A.D.S., Gerber, L.J, Vosloo, W., 2007. Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973–1999). Vet Microbiol;121:45–55.
36. Bulimo, W.D., Miskin, J.E.and Dixon, L.K., 2000. An ARID family protein binds to African swine fever virus encoded ubiquitin conjugating enzyme, UBCv1. FEBS Lett. 471, 17-22
37. Burrage, T.G., Lu, Z., Neila, J.G., Rock, D.L., Zsak, L., 2004. African swine fever virus multigene family 360 genes affect virus replication and generalization of infection in *Ornithodoros porcinus* ticks. J. Virol. 78, 2445–2453
38. Breese, S. S., Jr., and C. J. DeBoer. 1966. Electron microscope observation of African swine fever virus in tissue culture cells. Virology 28:420–428.
39. Brookes, S.M., Dixon, L.K. and Parkhouse, R.M., 1996. Assembly of African swine fever virus: quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo. Virology 224(1), 84-92.
40. Carrasco, L., Fernandez, A., Gomez Villamandos, J.C., Mozos, E., Mendez, A., Jover, A., 1992. Kupffer cells and PIMs in acute experimental African swine fever. Histol Histopathol 7, 421-425.
41. Carrascosa, J.L., Carazo, J.M., Carrascosa, A.L., Garcia, N., Santisteban, A., Vinuela, E., 1984. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. Virology 132, 160-172.
42. Chapman, D.A., Tcherepanov, V., Upton, C., Dixon, L.K., 2008. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. J Gen Virol 89, 397-408.
43. Colgrove GS, Haelterman EO, Coggins L. 1969. Pathogenesis of African swine fever in young pigs. Am J Vet Res, 30:1343-1359.
44. Costard, S., Randriamparany, T., Humbert, C., Franco, S., Rasamoelina, H., Rakotoharinome, M., Rakotondrahanta, S., Albina, E., Roger, F., Pfeiffer, D.U., 2009. Estimating the prevalence of African swine fever in Madagascar. In: 12th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Durban, South Africa
45. Costard, S., Porphyre, V., Messad, S., Rakotondrahanta, S., Vidon, H., Roger, F., Pfeiffer, D.U., 2009a. Multivariate analysis of management and biosecurity practices in smallholder pig farms in Madagascar. Preventive Veterinary Medicine 92 (3), 199–209, <http://dx.doi.org/10.1016/j.preventmed.2009.08.010>.

46. Cruci re, C. 2003. Peste Porcine Africaine. In : Lefèvre, P.C., Blancou, J., Chermette, R. Principales maladies infectieuses et parasitaires du b tail ; Europe et régions chaudes. 1: 735-746.
47. Cubillos C, Gómez-Sebastian S, Moreno N, Nuñez MC, Mulumba-Mfumu LK, Quembo CJ, Heath L, Etter EM, Jori F, Escribano JM, Blanco E. 2013. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. 173(1):159-67
48. Cunha, C.V., Costa, J.V., 1992. Induction of ribonucleotide reductase activity in cells infected with African swine fever virus. *Virology* 187, 73-83.
49. De Boer, C.J.D., Hess, W.R. and Dardiri, A.H., 1969. Studies to determine the presence of neutralizing antibody in sera and kidney from swine recovered from African swine fever. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 27, 44-54.
50. de Carvalho Ferreira, H.C., Weesendorp, E., Elbers, A.R., Bouma, A., Quak, S., Stegeman, J.A., Loeffen, W.L., 2012. African swine fever virus excretion patterns in persistently infected animals: A quantitative approach. *Vet Microbiol* 160 327-340.
51. De la Vega, I. Gonzalez, A. Blasto, R. Calvo, V. and Viñuela, E., 1994. Nucleotide Sequence and Variability of the Inverted Terminal Repetitions of African Swine Fever Virus DNA, *Virology* 201, 152-1565.
52. De la Vega, I., Vinuela, E., Blasco, R., 1990. Genetic variation and multigene families in African swine fever virus. *Virology* 179, 234-246.
53. De Swart, R.L., Nur, Y., Abdallah, A., Kruining, H., El Mubarak, H.S., Ibrahim, S.A., Van Den Hoogen, B., Groen, J., Osterhaus, A.D., 2001. Combination of reverse transcriptase PCR analysis and immunoglobulin M detection on filter paper blood samples allows diagnostic and epidemiological studies of measles. *J. Clin. Microbiol.* 39, 270–273.
54. De Tray DE. Persistence of viremia and immunity in African swine fever. *Am J Vet Res* 1957; 18:811–6.
55. Dixon, L.K., Abrams, C.C., Bowick, G., Goatley, L.C., Kay-Jackson, P.C., Chapman, D., Liverani, E., Nix, R., Silk, R., and Zhang, F., 2004. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet. Imm. Immunopath.* 100, 117-134.
56. Dixon L.K., Chapman D.A.G., Netherton C.L., Upton C. 2013. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Research.* 173. 3–14
57. Dixon, L.K., Escribano, J.M., Martins, C., Rock, D. L., Salas, M. L. & Wilkinson, P. J., 2005 Asfarviridae. In *Virus taxonomy. VIIIth Report of the ICTV* (eds C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball), pp. 135–143. London, UK: Elsevier/Academic Press.
58. Dixon, L.K., Twigg, S.R.F., Baylis, S.A., Vydelingum, S., Bristow, C., Hammond, J.M., Swith, G.L., 1994. Nucleotide-sequence of a 55 kbp region from the right end of the genome of a pathogenic African swine fever virus isolate (Malawi Lil20/1). *J. Genet. Virol.* 75, 1655-1684.
59. Edelsten, R.M., Chinombo, D.O., 1995. An outbreak of African swine fever in the southern region of Malawi. *Rev Sci Tech* 14, 655-666.

60. EFSA (European Food Safety Authority), 2010: WAHID Database. Follow-up report No: 48, OIE Ref: 10170. Available at (http://web.oie.int/wahis/reports/en_fup_0000010170_20110119_180731.pdf) (accessed January 22, 2011)
61. Ekue, N.F., Wilkinson, P.J., Wardley, R.C., 1989, Infection of pigs with the Cameroon isolate (Cam/82) of African swine fever virus. *Journal of comparative pathology* 100, 145-154.
62. El Hicheri, K., Gomez-Tejedor, C., Penrith, M.-L., Davies, G., Douati, A., Edoukou, G., Wojciechowski, K., 1998. L'épizootie de peste porcine africaine de 1996 en Côte d'Ivoire. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 17 (3), 660-673.
63. Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M.L., Salas, J., and Rodriguez, J.M., 2006. Generation of filamentous instead of icosahedral particles by repression of African swine fever virus structural protein pB438L. *J. Virol.* Publié en ligne, sous presse.
64. Fernandez, A., Pérez, J., Carrasco, L., Bautista, M.J., Sanchez-Vizcaino, J.M., Sierra, M.A. 1992a. Distribution of ASFV antigens in pig tissues experimentally infected with two different Spanish virus isolates. *J Vet Med (B)* 39, 393-402.
65. Fernandez, A., Perez, J., Carrasco, L., Sierra, M.A., Sanchez-Vizcaino, J.M., Jover, A. 1992b. Detection of African swine fever viral antigens in paraffin-embedded tissues by use of immunohistologic methods and polyclonal antibodies. *Am J Vet Res* 53, 1462-1467.
66. FAO 1998a. African swine fever in West Africa: Togo, Senegal, Gambia and Guinea-Bissau. [French] Mission report from 1 to 16 June 1998. Available on <http://www.fao.org/docrep/field/382969.htm>
67. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
68. Fernandez Garcia JM (1970) Aportaciones al conocimiento da la biologia de *Ornithodoros erraticus* (Lucas, 1849). *Anales de la Facultad de Veterinaria de Leon* 16: 195-208.
69. Fernández-Pinero, J., Gallardo, C., Elizalde, M., Robles, A., Gómez, C., Bishop, R., Heath, L., Couacy-Hymann, E., Fasina, F. O., Pelayo, V., Soler, A. and Arias, M. (2012), Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x
70. Fischer, M.G., Allen, M.J., Wilson, W.H., Suttle, C.A. 2010. Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. (107), 45. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1007615107.
71. Garcia-Beato, R., M. L. Salas, E. Vinuela, and J. Salas. 1992. Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology* 188:637-649.
72. Geering, W.A., Penrith, M.L., Nyakahuma, D. Manual on the preparation of Africa swine fever contingency plans. *Animal Health Manual*. FAO, Rome. 2001, 11, 74p.
73. Giammarioli, M., C. Pellegrini, C. Casciari, and G. M. De Mia, 2008: Development of a novel hot-start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus. *Vet. Res. Commun.* 32, 255-262.
74. Goatley, L.C., Twigg, S.R.F., Miskin, J.E., Monaghan, P., St-Arnaud, R., Smith, G.L. and Dixon, L.K., 2002. The African swine fever virus protein p4R binds to the alpha chain of nascent polypeptide-associated complex. *J. Virol.* 76, 9991-9999.
75. Gomez-Puertas, P., Oviedo, J.M., Rodriguez, F., Coll, J., Escribano, J.M., 1997. Neutralization susceptibility of African swine fever virus is dependent on the phospholipid composition of viral particles. *Virology* 228, 180-189.
76. Gomez-Puertas, P., Rodriguez, F., Oviedo, J.M., Brun, A., Alonso, C., Escribano, J.M., 1998. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus

- attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology* 243, 461-471.
77. Gómez-Puertas, P., Rodríguez, F., Oviedo, J.M., Ramiro-Ibáñez, F., Ruis-Gonzalvo, F., Alonso, C., Escribano, J.M., 1996. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J. Virol.* 70(8), 5689-5694.
 78. Gonzague, M., Roger, F., Bastos, A., Burger, C., Randriamparany, T., Smondack, S., Cruciére, C., 2001. Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar. *Epidemiol. Infect.* 126, 453–459.
 79. Gonzales, A., Talavera, A., Almendral, J.M. and Vinuela, E., 1986. Hairpin loop structure of African swine fever virus-DNA. *Nucleic Acids Res* 14, 6835-6844.
 80. Hay, S. and Kannourakis, G., 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J. Gen. Virol.* 83, 1547-1564.
 81. Heath, C.M., Windsor, M., Wileman, T., 2001. Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly. *J Cell Biol* 153, 449-455.
 82. Haresnape J.M., Wilkinson P.J., Mellor P.S., 1988. Isolation of African swine fever virus from ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) collected within the African swine fever enzootic area of Malawi. *Epidemiol Infect* 101(1): 173-85.
 83. Hernaez, B., Escribano, J.M., Alonso, C., 2006. Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera. *Virology* 350, 1-14.
 84. Helfand, R.F., Keyserling, H.L., Williams, I., Murray, A., Mei, J., Moscattiello, C., Icenogle, J., Bellini W.J., 2001. Comparative Detection of Measles and Rubella IgM and IgG Derived From Filter Paper Blood and Serum Samples. *Journal of Medical Virology* 65, 751–757.
 85. Hjertner, B., Meehan, B., McKillen, J., McNeilly, F., Belák, S., 2005. Adaptation of an Invader assay for the detection of African swine fever virus DNA. *J. Virol. Methods* 124, 1–10.
 86. Hutet, E., Chevallier, S., Eloit, M., Touratier, A., Blanquefort, P., Albina, E., 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome antibody detection on filter discs. *Rev. Sci. Tech.* 22, 1077–1085.
 87. Iyer, L.M., Balaji, S., Koonin, E.V., Aravind, L. 2006. Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res.* 117:156-184.
 88. James H E. , K. Ebert , R. McGonigle , Scott M. Reid , Neil Boonham , Jennifer A. Tomlinson , Geoffrey H. Hutchings, Mick Denyer, Chris A.L. Oura, Juliet P. Dukes, Donald P. King. 2010. Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 164 (2010) 68–74
 89. Joseph, H. M., and W. Melrose, 2010: Applicability of the filter paper technique for detection of antifilarial IgG4 Antibodies using the Bm14 Filariasis CELISA. *J. Parasitol. Res.* 2010, 6.
 90. Karalyan Z, Hovakim Z, Hranush A, Khachik S, Henrik V, Lina H, Liana A, Aida A and Elena Karalova. 2012. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. *Veterinary Research*, 8:18.

91. King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D., Drew, T.W., 2003. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods* 107, 53–61.
92. King, K., Chapman, D., Argilaguët, J.M., Fishbourne, E., Hutet, E., Cariolet, R., Hutchings, G., Oura, C.A.L., Netherton, C. L., Moffat, K., Taylor, G., Le Potier, M-F., Dixon, L.K., Takamatsu, H-H. 2011. Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunization. *Vaccine*. **29**, 4593– 4600.
93. Koonin, E.V., Yutin, N., 2010. Origin and evolution of eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses. *Intervirology* 53, 284–292.
94. Kovalenko, Y.R., 1965. Methods for infected pigs with African swine fever. *Tr Vsesoiuznogo Inst Eksp Vet* 31, 336-341.
95. Kuznar, J., Salas, M.L., Viñuela, E., 1980. DNA-dependent RNA polymerase in African swine fever virus. *Virology* 101, 169–175.
96. Leitaó, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R.M.E., Portugal, F.C., Vigario, J.D., Martins, C.L.V., 2001. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol* 82, 513-523.
97. Leitaó, A., Malur, A., Cornelis, P. and Martins C.L.V., 1998. Identification of a 25-aminoacid sequence from the major African swine fever virus structural protein VP72 recognised by porcine cytotoxic T lymphocytes using a lipoprotein based expression system. *J. Virol. Meth.* 75, 113-119.
98. Le Potier, M-F., and C. Marce, 2013: Nouvelle avancée de la Peste Porcine Africaine aux frontières de l'Europe: la Biélorussie atteinte. African Swine Fever is in the vicinity of Europe: first case notified in Belarus. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 58, 23–24.
99. Lewis, T., Zsak, L., Burrage, T.G., Kutish, G.F., Neilan, J.G. and Rock, D.L. 2000. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J. Virol.* 72(3), 1275-1285.
100. Lubisi, B.A., Bastos, A.D., Dwarka, R.M., Vosloo, W. 2005. Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch Virol* 150, 2439-2452.
101. Lubisi, B. A., Dwarka, R. M., Meenowa, D., Jaumally, R. 2009. An Investigation into the First Outbreak of African Swine Fever in the Republic of Mauritius. *Transboundary and Emerging Diseases*. 56, 178–188.
102. Lyra TMP (2006). The eradication of African swine fever in Brazil, 1978–1984. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 25: 93–103.
103. MAEP – UPDR. Rapport annuel, filière porcine. 2004
104. Malmquist, W.A., Hay, D., 1960. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.* 21, 104–108.
105. Manso Ribeiro J, Azevedo R, Teixeira J, et al. 1958. An atypical strain of swine fever virus in Portugal. *Bull. Off. Int. Epiz.* 50:516-534.
106. Manso Ribeiro, J. J., and J. A. Azevedo, 1961. La peste porcine Africaine au Portugal. *Bull. Off. Int. Epiz.* 55, 88–108.

107. Martin Hernandez, A.M. and Tabares, E. 1990. Expression and characterization of the thymidine kinase gene of African swine fever virus. *J. Virol* 65(2), 1046-1052
108. Martins CL, Lawman MJ, Scholl T, Mebus CA, Lunney JK. 1993. African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Arch Virol* 129: 211–225.
109. Mc Cullough, K.C., Basta, S., Knotig, S., Gerber, H., Schffner, R., Kim, Y.B. and Saalmuller A., 1999. Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology* 98, 203-212.
110. McKercher, P.D., Hess, W.R. and Hamdy, F., 1978. Residual viruses in pork products. *Appl Environ Microbiol.* 35(1), 142-145.
111. McVicar, J.W., 1984. Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. *American journal of veterinary research* 45, 1535-1541
112. Mebus CA (1988) African swine fever. *Adv Virus Res* 35: 251–269.
113. Michaud, V., Dixon, L., Romero, L., Marie-Frédérique Le Potier, M-F., Roger,F., Albina, E., 2004.PCR directe pour la détection du génome du virus de la peste porcine africaine à partir de prélèvements de sang sur buvard. *Journées Recherche Porcine.* 36, 323–326.
114. Michaud, V., Gil,P., Kwiatek, O., Prome,S., Dixon,L., Romero,L., Le Potier,M-F., Arias,M., Couacy-Hymann,E., Roger,F., Libeau,G., Albina,E., 2007. Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *Journal of Virological Methods.* 146, 257–265
115. Michaud V, Randriamparany T, Albina E. 2013. Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of African Swine Fever Virus: Proposal for a New Classification and Molecular Dating of the Virus. *PLoS ONE* 8(7): e69662. doi:10.1371/journal.pone.0069662
116. Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. and Tschopp, J. 2001. NF-kappa B signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5299-5305.
117. McKillen, J., M. McMenamy, B. Hjertner, F. McNeilly, A. Uttenthal, C. Gallardo, B. Adair, and G. Allan. 2010 : Sensitive detection of African swine fever virus using real-time PCR with a 5' conjugated minor groove binder probe. *J. Virol. Methods* 168, 141–146.
118. Missohou, A., Niang, M., Foucher, H., Dieye, P.N., 2001. Pig production systems in Lower Casamance (Senegal). *Cahiers Agricultures* 10, 405–408.
119. Montgomery, R.E., 1921. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol.* 34, 159-191; 243-262.
120. Mur, L., Boadella, M., Martínez-López, B., Gallardo, C., Gortazar, C., Sánchez-Vizcaíno, JM., 2012. Monitoring of African Swine Fever in the Wild Boar Population of the Most Recent Endemic Area of Spain. *Transbound Emerg Dis.* doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01308.x.
121. Nana-Nukechap, M. F., and E. P. Gibbs, 1985: Socioeconomic effects of African swine fever in Cameroon. *Trop. Anim. Health Prod.* 17, 183–184.
122. Neilan, J.G., Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T.G., Kutish, G. and Rock, D.L., 2004. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology* 319, 337-342.

123. Netherton, C.L., Wileman, T.E., 2013. African swine fever virus organelle rearrangements. *African swine fever virus. Virus Research* : 73(1). 76–86.
124. Nix, R. J., Gallardo, C., Hutchings, G., Blanco, E. & Dixon, L. K. 2006. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol* 151, 2475–2494.
125. OIE. 2008. Annual sanitary informations. 2008, from <http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=home>
126. OIE. 2013. African Swine Fever in Belarus. Immediate Notification Ref OIE 13663; Report Date 24/06/2013. http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000013663_20130624_102939.pdf Accessed 24/06/2013.
127. Oleaga-Perez A, Perez-Sanchez R, Encinas-Grandes A. 1990. Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *Vet Rec* 126: 32–37.
128. Oliveros, M., R. J. Yanez, M. L. Salas, J. Salas, E. Vinuela, and L. Blanco. 1997. Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 272:30899–30910.
129. Oliveros, M., Garcia-Escudero, R., Alejo, A., Vinuela, E., Salas, M.L., Salas, J., 1999. African swine fever virus dUTPase is a highly specific enzyme required for efficient replication in swine macrophages. *J Virol.* 73, 8934-8943.
130. Onisk, D.V., Borca, M.V., Kutish, G., Kramer, E., Irusta, P. and Rock, D.L. 1994. Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology* 198, 350-354.
131. Oura CAL, Powell PP, Anderson E, Parkhouse RME, 1998. The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J Gen Virol.* 79: 1439-1443.
132. Pena, L., Yáñez, R.J., Revilla, Y., Vinuela, E., Salas, M.L., 1993. African swine fever virus guanylyltransferase. *Virology* 193, 319–328.
133. Penrith, M.-L., Thomson, G.R. & Bastos, A.D.S. 2004. African swine fever. *Infectious Diseases of Livestock* , 2nd edn (ed.by J. A. W. Coetzer and R. C. Tustin), pp. 1087–1119. Oxford University Press, Cape Town.
134. Penrith, M.-L., Thomson, G.R., Bastos, A.D.S., Phiri, O.C., Lubisi, B.A., Botha, B., Esterhuysen, J., Du Plessis, E.C., Macome, F. & Pinto, F. 2004b. An investigation into natural resistance to African swine fever in domestic pigs from an endemic area in southern Africa. *Revue scientifique et technique, Office International des Épizooties*, 23: 665–677.
135. Penrith, M. L., Lopes Pereira, C., Lopes Da Silva, M. M. R., Quembo, C., Nhamusso, A., and Banze, J. 2007. African swine fever in Mozambique: review, risk factors and considerations for control. *Onderstepoort J Vet Res* 74, 149-160.
136. Penrith, M. L., and W. Vosloo, 2009: Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 80, 58–62.
137. Penrith M-L, Vosloo W, Jori F, Bastos A.D.S, 2013.. African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Research* 173, 228– 246
138. Perez-Martin, E., J. Arguilaget, M. Perez-Filgueira, C. Gallardo, J. Pujols, M. Nofrarias, I. Diaz, N. Fernandez-Borges, J. Salguero, E. Blanco, J. M. Escribano, and F. Rodriguez, 2006: Development of

new DNA vaccine strategies against African swine fever. Proceedings of the 7th International Congress of Veterinary Virology. Lisbon, Portugal, page 118.

139. Pini, A., Hurter, L.R., 1975. African swine fever: An epizootiological review with special reference to the South African situation. *J S Afr Vet Assoc* 46:227-232.
140. Plowright, W., Parker, J., 1967. The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Arch Gesamte Virusforsch* 21, 383-402.
141. Plowright, W., Perry, C.T., Pierce, M.A., 1970. Transovarial infection with African swine fever virus in the Argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res Vet Sci* 2: 582-584.
142. Plowright, W., 1981. African swine fever. In : Davis, J. W., Karstad, L. H. and D. O. Trainer (eds.) *Infectious diseases of wild mammals*. 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa: 178-190.
143. Plowright, W., C. T. Perry, M. A. Pierce, and J. Parker. 1970. Experimental infection of the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, with African swine fever virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 31:33-50.
144. Plowright, W., Thomson, G.R., Naser, J.A., 1994. African swine fever. In *Infectious Diseases of livestock with special reference to Southern Africa* (J.A.W.Coetzer, G.R.Thomson, & R.C.Tustin, eds) Cape Town Oxford University Press, 567-599.
145. Powell, P.P., Dixon, L.K. and Parkhouse R.M.E., 1996. An IkB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokines responses in host macrophages. *J. Virol.* 70(12), 8527-8533.
146. Ramiro-Ibanez, F., Ortega, A., Brun, A., Escribano, J.M., Alonso, C., 1996. Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J Gen Virol* 77 (Pt 9), 2209-2219.
147. Randriamparany, T., Grenier, A., Tourette, I., Maharavo Rahantamalala C.M., Rousset, D., 2005. Lancelot, R. Situation épidémiologique de la peste porcine africaine dans la région du lac Alaotra (Madagascar) et conséquences possibles pour l'organisation de la lutte et de la surveillance. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop*, 58 (1-2) : 15-20
148. Ravaomanana, J., Jori, F., Vial, L., Pérez-Sánchez, R., Blanco, E., Michaud, V., Roger, F., 2011. Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in northwestern Madagascar. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(3), 247-254.
149. Revilla, Y., Cebrian, A., Baixeras, E., Martinez, C., Viñuela, E and Salas, M.L., 1997. Inhibition of apoptosis by African swine fever virus bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology* 228, 400-404.
150. Rojo, G., Garcia-Beato, R., Vinuela, E., Salas, M.L., Salas, J., 1999. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology* 257, 524-536.
151. Roger, F., Randriamahefa, N., Crucière, C., Rakoto Andrianarivelo, M., de Ruyter, T., Diallo, A., Ratovo, A., Domenech, J., Zeller, H., 1999. La Peste Porcine Africaine (PPA) à Madagascar : maladie émergente ou ancienne ? Mondial Vet 99. World Veterinary Congress Scientific Proceedings (Lyon, France, 23-26 September 1999). [*Communication personnelle*].

152. Rodriguez, J.M., Yanez, R.J., Almazan, F., Viñuela, E., Cuezva, J.M. and Salas, J., 1993. African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected-cells. *J Virol* 67, 5312-5320.
153. Rodriguez, F., Fernandez, A., Perez, J., delasMulas, J.M., Sierra, M.A., Jover, A., 1996a. African swine fever: Morphopathology of a viral haemorrhagic disease. *Vet Rec* 139, 249-254.
154. Rodriguez, F., Ley, V., Gómez-Puertas, P., Garcia, R., Rodriguez, J.F. and Escribano, J.M., 1996b. The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability. *Virus Res* 40, 161-167.
155. Rodriguez, J.M., Garcia-Escudero, R., Salas, M.L., Andres, G., 2004. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J Virol* 78, 4299-1313.
156. Rodríguez JM., Salas ML. 2013. African swine fever virus transcription. *Virus Research* 173, 15– 28
157. Rodriguez, J.M., Yanez, R.J., Almazan, F., Viñuela, E., Cuezva, J.M. and Salas, J., 1993. African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected-cells. *J. Virol.* 67, 5312-5320.
158. Rojo, G., Chamorro, M., Salas, M.L., Viñuela, E., Cuezva, J.M. and Salas, J., 1998. Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J. Virol.* 72, 7583-7588.
159. Roger F., Randriamahefa N., Cruci  re C., Zeller H., Andriambololona R., Domenech J., 1999. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 92 (4) :[2] p. Colloque du réseau international des Instituts Pasteur et institutions associées : Veille microbiologique et émergence : aspects moléculaires, environnementaux et technologiques. 3, 1999-10-14/1999-10-15, Paris, France.
160. Roger, F., Ratovonjato. J., Vola, P., Uilenberg, G., 2001. *Ornithodoros porcinus* ticks, bushpigs, and African swine fever in Madagascar. *Exp. Appl. Acarol.* 25(3): 263-269.
161. Ronish, B., M. Hakhverdyan, K. Sta  hl, C. Gallardo, J. Fernandez-Pinero, S. Belak, N. Leblanc, and L. Wangh, 2011: Design and verification of a highly reliable Linear-After- The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods* 172, 8–15.
162. Rouillier, I., Brookes, S.M., Hyatt, A.D., Windsor, M. and Wileman, T., 1998. African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum, *J Virol* 72(3), 2373- 2387.
163. Rousset, D., Randriamparany, T., Maharavo Rahantamalala, C.Y., Randriamahefa, N., Zeller, H., Rakoto-Andrianarivelo, M., Roger, F., 2001. [African swine fever introduction into Madagascar, history and lessons from an emergence]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 67, 31-33.
164. Rowlands, R.J., Michaud, M., Heath, L., Hutchings, G., Oura, C., Vosloo, W., Dwarka, R., Onashvili, T., Albina, E., Dixon, L.K. 2008. African Swine Fever Virus Isolate, Georgia 2007. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 12,
165. Ruis-Gonzalvo, F., Carnero, M.E., Caballero, C. and Martinez, J., 1986. Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever-resistant pigs. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1858-1862.
166. Ruiz-Gonzalvo, F., Rodriguez, F., Escribano, J.M. 1996. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology* 218, 285-289.
167. Salas, J., M. L. Salas, and E. Viñuela. 1999. African swine fever virus: a missing link between poxviruses and iridoviruses?, p. 467–480. In E. Domingo, R. G. Webster, and J. J. Holland (ed.), *Origin and evolution of viruses*. Academic Press, London, United Kingdom.

168. Salguero FJ, Sánchez-Cordón PJ, Núñez A: Fernández de Marco M, Gómez-Villamandos JC. 2005. Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever virus infection. *J Comp Pathol*, 132:289-302.
169. Sanchez Botija, C., 1982. African swine fever: new developments. *Rev. Sci Tech* 1(4): 1065-1094.
170. Sanchez-Torres, C., Gomez-Puertas, P., Gomez-del-Moral, M., Alonso, F., Escribano, J.M., Ezquerro, A., Dominguez, J., 2003. Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch Virol* 148, 2307-2323.
171. Sánchez-Vizcaíno, J. M. 1999. African swine fever. In A. D. Leman, B. E. Straw, W.L. Mengeling, S. Dallaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames. 93-102.
172. Sanchez-Vizcaino, J. M., 2006: African swine fever. In: Straw, B. E., J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (eds), *Diseases of Swine*, 9th edn, pp. 291–298. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa.
173. Sanchez-Vizcaino J. M., Mur L. and B. Martinez-Lopez. 2012. African Swine Fever: An Epidemiological. *Transboundary and Emerging Diseases*. 59 (1), 27–35.
174. Schwarz G., 1978. Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6: 461–464.
175. Shirai, J., Kanno, T., Tsuchiya, Y., Mitsubayashi, S., Seki, R., 2000. Effects of chlorine, iodine, and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses. *J Vet Med Sci*. 62(1), 85-92.
176. Sogo, J. M., J. M. Almendral, A. Talavera, and E. Vinuela. 1984. Terminal and internal inverted
177. Suarez, C., Gutierrez-Berzal, J., Andres, G., Salas, M.L., Javier M. Rodríguez, J.M., 2010. African Swine Fever Virus Protein p17 Is Essential for the Progression of Viral Membrane Precursors toward Icosahedral Intermediates. *J. Virol*, 84:15, p. 7484–7499.
178. Steiger I., Ackermann M., Mettraux C., Kihm U., 1992. Rapid and Biologically Safe Diagnosis of African Swine Fever Virus. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1–8.
179. Sugiura N (1978). Further analysis of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections. *Communication in Statist Theor Meth* 7: 13–26.
180. Sumption, K.J., Hutchings, G.H., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., 1990. Variable regions on the genome of Malawi isolates of African swine fever virus. *J. Gen. Virol.* 71, 2331–2340.
181. Tamura K & Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
182. Tulman, E.R., Delhon, G.A., Ku, B.K., Rock, D.L., 2009. African swine fever virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 328, 43–87.
183. Turner, C., Williams, S.M., 1999. Laboratory-scale inactivation of African swine fever virus and swine vesicular disease virus in pig slurry. *J Appl Microbiol* 87, 148-157.
184. Thomson, G. R., Gainaru, M.D., Van Dellen, A.F. 1980. Experimental infection of warthog (*Phacochoerus aethiopicus*) with African swine fever virus. *Onderstepoort J Vet Res*, 47, 19-22.
185. Valdeira, M.L., Bernardes, C., Cruz, B., Geraldès, A., 1998. Entry of African swine fever virus into Vero cells and uncoating. *Vet Microbiol* 60, 131-140.

186. Valdeira, M.L., and Geraldles, A., 1985. Morphological study on the entry of African swine fever virus into cells. *Bio. Cell.* 55 (1-2), 35-40.
187. Vallee, I., Tait, S.W., Powell, P.P., 2001. African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. *J Virol* 75, 10372-10382.
188. Vilcek, S., Strojny, L., Durkovic, B., Rossmanith, W., Paton D. 2001. Storage of bovine viral diarrhoea virus samples on filter paper and detection of viral RNA by a RT-PCR method. *J Virol Methods.* 92, 19–22.
189. Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J., and Vinuela, E., 1993a. Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever virus. *Arch. Virol.* 133, 467-475.
190. Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J., and Vinuela, E., 1993b. Haemostatic abnormalities in African swine fever. A comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). *Arch. Virol.* 130, 71-83.
191. Wardley, R.C. and Wilkinson, P.J., 1985. An immunological approach to vaccine against African swine fever virus. *Vaccine* 3, 54-56.
192. Wilkinson, P. J., 1986: Epidemiology of African swine fever. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 5, 487–493.
193. Wilkinson, P.J. 1989. African swine fever virus. In 'Virus Infections of Vetebrates. Vol 2: Virus infections of porcines.' (Ed. M. B. Penjaert.) pp. 17-35. (Elsevier).
194. Wilkinson, P.J., Wardley, R.C., Williams, S.M., 1981. African swine fever virus (Malta-78) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 91, 277–284.
195. World Organization for Animal Health, 2011: WAHID Database. Disease Information. Available at (http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_immediate_summary) (accessed January 24, 2011).
196. Yanez, R.J., Rodriguez, J.M., Nogal, M.L., Yuste, L., Enriquez, C., Rodriguez, J.F., Vinuela, E., 1995. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* 208, 249-278.
197. Yanez, R. J., and E. Vinuela. 1993. African swine fever virus encodes a DNA ligase. *Virology* 193:531–536.
198. Yozawa, T., Kutish, G.F., Afonso, C.L., Lu, Z., Rock, D.L., 1994. Two novel multigene families, 530 and 300, in the terminal variable regions of African swine fever virus genome. *Virology* 202, 997-1002.
199. Zsak, L., Borca, M.V., Risatti, G.R., Zsak, A., French, R.A., Lu, Z., Kutish, G.F., Neilan, J.G., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Rock, D.L., 2005. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 43, 112–119.

ANNEXE I

REVIEW ARTICLE

African Swine Fever Diagnosis Adapted to Tropical Conditions by the Use of Dried-blood Filter Papers

T. Randriamparany^{1,*}, K. V. Kouakou^{2,*}, V. Michaud^{3,4}, J. Fernández-Pinero⁵, C. Gallardo⁵, M.-F. Le Potier⁶, R. Rabenarivahiny¹, E. Couacy-Hymann⁷, M. Raherimandimby⁸ and E. Albina^{4,9}

¹ Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire, Antananarivo, Madagascar

² Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole, Bingerville, Côte d'Ivoire

³ CIRAD, UMR CMAEE, Montpellier, France

⁴ INRA, UMR1309 CMAEE, Montpellier, France

⁵ Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, Spain

⁶ Anses, Laboratoire de Ploufragan, Unité Virologie Immunologie Porcine, Ploufragan, France

⁷ LAMADA, Laboratoire Central de Pathologie Animale, Bingerville, Côte d'Ivoire

⁸ Université d'Antananarivo, Antananarivo, Madagascar

⁹ CIRAD, UMR CMAEE, Petit-Bourg, Guadeloupe, France

Keywords:

African swine fever; sample collection; filter paper; diagnosis; ELISA; PCR

Correspondence:

E. Albina, CIRAD, UMR CMAEE, Domaine Duclos, 97170 Petit Bourg, Guadeloupe, France. Tel.: +33 590 25 431; Fax: +33 5 90 940 396; E-mail: emmanuel.albina@cirad.fr

* These two authors contributed equally to this work.

Received for publication July 4, 2014

doi:10.1111/tbed.12295

Summary

The performance of Whatman 3-MM filter papers for the collection, drying, shipment and long-term storage of blood at ambient temperature, and for the detection of African swine fever virus and antibodies was assessed. Conventional and real-time PCR, viral isolation and antibody detection by ELISA were performed on paired samples (blood/tissue versus dried-blood 3-MM filter papers) collected from experimentally infected pigs and from farm pigs in Madagascar and Côte d'Ivoire. 3-MM filter papers were used directly in the conventional and real-time PCR without previous extraction of nucleic acids. Tests that performed better with 3-MM filter papers were in descending order: virus isolation, real-time UPL PCR and conventional PCR. The analytical sensitivity of real-time UPL PCR on filter papers was similar to conventional testing (virus isolation or conventional PCR) on organs or blood. In addition, blood-dried filter papers were tested in ELISA for antibody detection and the observed sensitivity was very close to conventional detection on serum samples and gave comparable results. Filter papers were stored up to 9 months at 20–25°C and for 2 months at 37°C without significant loss of sensitivity for virus genome detection. All tests on 3-MM filter papers had 100% specificity compared to the gold standards. Whatman 3-MM filter papers have the advantage of being cheap and of preserving virus viability for future virus isolation and characterization. In this study, Whatman 3-MM filter papers proved to be a suitable support for the collection, storage and use of blood in remote areas of tropical countries without the need for a cold chain and thus provide new possibilities for antibody testing and virus isolation.

Introduction

African swine fever virus (ASFV) is a large enveloped DNA virus (Dixon et al., 2005) that belongs to the family *Asfarviridae*, genus *Asfivirus*. It is the only known DNA arbovirus. African swine fever virus infects members of the

vertebrate family *Suidae* (domestic and feral pigs, wild boars, bush pigs, warthogs and the giant forest hog) and some *Argasid* ticks (*Ornithodoros* complex). It is one of the most fatal diseases of domestic pigs and wild boars and the most serious transboundary pig disease that could spread rapidly and have crippling socio-economic

consequences (Perrith and Nyakuhuma, 2000; Babalola et al., 2007).

African swine fever was first described in Eastern Africa at the beginning of the 20th century. The disease was restricted to many sub-Saharan countries until 1957 when the first outbreak outside the African continent occurred in Portugal. Subsequently, the virus spread to the Caribbean and South America in 1970s and 1980s (Arias et al., 2002). Meantime, the infection has been eradicated from Caribbean, South America and Europe except in Sardinia, where the disease still persists. However, recent introductions of the virus were reported in Western Africa (1997), Madagascar (1998), trans-Caucasian (2007), Russia (2007), Iran (2009), Ukraine (2012), Belarus (2013) and Estonia (2014) (Rowlands et al., 2008; Rahimi et al., 2010; Dietze et al., 2012; Le Potier and Maré, 2013). The infection is mainly detected in wild boars but also in domestic pigs (OIE, 2014) in Lithuania, Latvia and Poland, emphasizing the risk for Central and Eastern Europe (Callardo et al., 2014).

Laboratory diagnosis of ASF is based on the detection of the virus and specific ASF-antibodies. Virus isolation (VI) (Malmquist and Hay, 1960) in porcine bone marrow cells is a reliable and sensitive method, but it can take several days or even weeks to obtain the final result. In addition to antigen-detection immunoassays (Vidal et al., 1997; Hutchings and Ferris, 2006), several molecular tests including agarose gel-based PCR (Sejger et al., 1992; Agüero et al., 2003, 2004; Bairo et al., 2006) and real-time PCR (King et al., 2008; Zaak et al., 2005; Tignon et al., 2011; Fernández-Pinero et al., 2012) have also been developed and adopted for routine diagnostic purposes. The transport of infected materials for initial or confirmatory diagnosis of ASF infection in local, regional or international laboratories requires the use of a cold chain or the addition of preservative agents that do not interfere with the diagnostic procedures. The maintenance of a cold chain for the preservation of biological samples is often impossible in remote areas of tropical regions where the appropriate infrastructure is not available. There is thus a pressing need for a sampling and shipping procedure from the farm to the laboratory that does not rely on a cold chain.

In recent years, studies have demonstrated that samples could be poured and stored on filter papers at room temperature for relatively long periods (Pitcovski et al., 1999; Vilek et al., 2001; Utenethal et al., 2013). The use of blood samples dried on filter papers was described as a possible alternative to preserving human and animal samples for serological testing (Behets et al., 1992; De Swart et al., 2000; Helfand et al., 2001; Riddell et al., 2003; Johannessen et al., 2009; Joseph and Melrose, 2010). Filter papers have also been successfully used to store biological materials and to detect the presence of viral nucleic acids by PCR (Sejger et al., 1992; De Swart et al., 2001; Abdelwhab et al., 2011).

More recently, filter papers were used for virus isolation (Abdelwhab et al., 2011). Different types of filter papers were used in these studies, but all basically belonged to two main classes. The first class consists of filter papers specifically engineered for nucleic acid preparation and preservation. They contain impregnated matrices that lyse cells, denature proteins and protect nucleic acids from nucleases, thus providing additional useful inactivation of the biological material which theoretically makes it compatible with safe shipment without the need for containment. Whatman FTA cards belong to this category of filter papers. However, in the laboratory, they require extra-preparation such as rinsing and elution before being used for diagnosis and are not suitable for subsequent pathogen isolation. In contrast, other filter papers like Whatman 3-MM filter papers do not contain additives; they can thus preserve infectivity and can theoretically be used for further pathogen amplification. Another advantage is that they do not contain PCR inhibitor and can be directly used in conventional PCR without previous nucleic acid extraction, as has already been demonstrated in the detection of ASFV (Michaud et al., 2007).

Based on these results, this study was designed to assess whether Whatman 3-MM filter papers can be used for ASF diagnosis with a series of currently available tests that were originally designed for the ASF virus and antibody detection in conventional biological samples. These tests included conventional and real-time PCR, viral isolation and antibody detection by ELISA. In addition, the robustness and thermal stability of Whatman 3-MM filter papers were assessed.

Materials and Methods

Samples

The biological samples were obtained from pigs during field surveys or from pigs that were experimentally infected. Domestic pigs in infected areas in Madagascar were randomly sampled at slaughter houses in 2009. A total of 91 paired samples were collected from all pigs. The samples consisted of a spleen specimen and the corresponding blood dried on Whatman 3-MM filter papers (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The filter papers were stored at room temperature (22–25°C) for 9 months. In addition, 346 farm pigs in Côte d'Ivoire were bled for conventional serum collection and on 3-MM filter papers, the samples were tested to assess the specificity of the methods since the country has been free of the disease for at least 10 years until the recent introduction of the disease reported in September 2014.

Three experiments in contained facilities designed for vaccine testing, or intended to study the virulence of the isolate, generated paired EDTA blood, dried-blood 3-MM filter paper and serum samples. These samples 'trios' were used to determine the analytical sensitivity of the different

methods of diagnosis using 3-MM filter papers compared to the other biological materials. In the first experiment, four Landrace \times Large White pigs were inoculated intramuscularly with 10 HAD50/ml of the haemadsorbing ASFV Arm67 isolate. Two untreated pigs were maintained in contact, housed in the same pen as the inoculated animals. Paired samples were collected from these pigs on different days. The second experiment included two challenge groups of three pigs each, infected with ASF viruses either the virus strain Benin 97/1 or the Spain E75 isolate. The last experiment included two trials. Trial 1 involved six pigs that were first challenged with the non-virulent OURT88/3 isolate from Portugal and 3 weeks later, with the closely related virulent Portuguese isolate OURT88/1, and after a further 3 weeks, with the Benin 97/1 strain. Trial 2 included 16 pigs challenged with the Benin 97/1 isolate. Samples were collected on the day of challenge and thereafter at different intervals post-challenge, as described in the results section. The virus strains we used belong to genotype II (first experiment) and genotype I (second and third experiments), the only two genotypes that have spread beyond the African continent so far. All experimental challenges and use of animals were carried out in agreement with the European Directive 86/609 on the protection of animals used in scientific procedures and approved by the local ethical committee under the numbers 2010.05 for the two first experiments and 22-17 for the last experiment.

Samples preparation

Conventional samples

For tissues and blood samples, viral nucleic acids were prepared using the QIAamp viral DNA mini kit (QIAGEN, Venlo, the Netherlands) as previously described (King et al., 2003) and stored at -80°C until subsequent testing by PCR or real-time PCR assay.

Filter paper preparation

Whatman 3-MM filter papers, which are often used for the storage and detection of genetic or protein materials, were selected for this study. The 3-MM filter papers were cut into 5×0.5 cm strips. The strips were soaked in whole blood collected from slaughtered pigs and allowed to dry. Once dried, the filter papers were stored at room temperature (22 – 25°C) or at 37°C as previously described (Michaud et al., 2006) until use.

Diagnosis procedures

Direct conventional PCR

The highly conserved region of genome coding for p72 protein was amplified by PCR using the 5 prime Mastermix (Eppendorf, Montesson, France). 3-MM filter papers with

dried blood from infected pigs were directly placed in PCR tubes without previous extraction of nucleic acid. One piece of filter paper measuring 5 mm^2 was placed in each 0.2-ml PCR tube. Reaction mix was added to a final volume of $50 \mu\text{l}$ to allow proper immersion of the filter papers. The reaction mix contained $0.4 \mu\text{M}$ of forward primer: $5'$ -T C G G A G A T G T T C C A G G T A G G- $3'$ and reverse primer: $5'$ -G C A A A G G A T T G G T G A A T- $3'$. The PCR was run as follows: (i) 5 min at 95°C ; (ii) 35 cycles for 30 s at 95°C , 30 s at 55°C , and 30 s at 72°C ; (iii) 7 min at 72°C . A PCR fragment of 346 base pairs was visualized on agarose gel. A negative control from an uninfected pig was included. Fragment size was defined by comparison with DNA ladders.

Using the same master mix and primers, $15 \mu\text{l}$ of DNA extracted from blood and tissues was run in final volumes of $50 \mu\text{l}$. The reaction mixture was treated as follows: (i) 5 min at 95°C ; (ii) 35 cycles, 30 s at 95°C , 30 s at 60°C and 30 s at 72°C ; (iii) 10 min at 72°C .

Real-time PCR

Two real-time PCRs were evaluated. The first was the CBE reference method derived from King et al. (2003), which was carried out using 2 \times Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) according to the manufacturer's instructions. Primers at a final concentration of $0.4 \mu\text{M}$ ($5'$ -C T G C T C A T G G T A T C A A T C T T A T C G A- $3'$, $5'$ -G A T A C C A C A A G A T C R G C C G T- $3'$) and a TaqMan probe at a final concentration of $0.25 \mu\text{M}$ ($5'$ -[6-carboxy-fluorescein(FAM)]-C C A C G G G A G G A A T A C C A A C C C A G T G- $3'$ -[6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)]) were added to $20 \mu\text{l}$ of the appropriate master mix. The reactions were made up in final volumes of $40 \mu\text{l}$ consisting of either one 1.25-mm^2 piece of 3-MM filter paper or $2 \mu\text{l}$ of DNA template, $20 \mu\text{l}$ of the appropriate master mix, $0.4 \mu\text{M}$ of each primer, $0.25 \mu\text{M}$ of the probe and 18 or 16 μl of water for 3-MM filter paper and DNA, respectively. Water instead of master mix was added to allow correct immersion of 3-MM filter paper without increasing the reagent cost of the PCR. The cycle consisted of 3 min at 95°C , and 45 cycles for 10 s at 95°C and 30 s at 58°C .

The second real-time PCR was based on the use of a Universal Probe Library (UPL, Fernández-Pinero et al., 2012). One 1.25-mm^2 piece of 3-MM filter paper or $2 \mu\text{l}$ of DNA template were added to a reaction mixture using Light Cycler 480 Probe Master (2 \times) (Applied Biosystems), consisting of $0.4 \mu\text{M}$ sense primer, $0.4 \mu\text{M}$ anti-sense primer and $0.1 \mu\text{M}$ probe UPL. The reaction mixture was the same as the King reaction for filter papers and DNA.

For the two real-time PCRs, amplification was run on an Mx3005P real-time PCR machine (Stratagene; Agilent technologies, Courtaboeuf, France). During the preliminary tests that were conducted, the King real-time PCR was less

performing than the UPL real-time PCR. The King real-time PCR was consequently progressively abandoned, and only, the UPL real-time PCR was used for all assessments.

Virus isolation on macrophages

Alveolar macrophages were collected from the lungs of piglets according to Baron et al. (1992). This procedure was also approved by the ethical committee under the number I2AN001. Briefly, piglets were anesthetized, exsanguinated and their lungs collected. The lungs were washed with PBS, and the collected cells were rinsed and cultured in tissue flasks containing MEM medium supplemented with 10% foetal bovine serum, penicillin-streptomycin and amphotericin B. Individual 0.5-cm² pieces of 3-MM filter paper were ground in MEM medium and the supernatant used to infect the macrophages. The cells were kept for 5–7 days at 37°C, and haemadsorption and cytopathic effects were checked daily.

Elution of antibodies from 3-MM filter papers for antibody detection by ELISA and evaluation of test performances

Paired samples (3-MM filter papers containing dried blood and sera) were collected from experimentally infected pigs. A 40-mm² piece of 3-MM filter paper containing dried blood was removed and added to a volume of 100 µl of the ELISA buffer (Ingelvac PPA Compac, Ingelvac, Spain). After incubation for 2 h, the eluate was collected and tested in the ELISA kit specifically designed by the company for this purpose. Sera were tested in the commercial version of this kit according to the manufacturer's instructions.

Detection limit according to the size of 3-MM filter papers and thermal stability of the material

The effect of the size of the piece of 3-MM filter paper on the sensitivity of the PCR diagnosis was evaluated. Seven threefold serial dilutions (1 : 3 to 1 : 2187) of the virus strain E70 titrating 10^{6.8} TCID₅₀/ml on porcine alveolar macrophages were prepared in porcine blood. 3-MM filter papers were cut into 50 × 2.5 mm strips, and the strips were soaked in each dilution. The 3-MM filter papers were then dried and stored at room temperature (22–25°C) until use. 3-MM filter papers were cut into different sizes ranging from 0.3 to 6.25 mm² and finally added in the PCR tubes containing the mix. The conventional and UPL PCRs were then run directly.

The stability of the 3-MM filter papers containing the dried blood was determined on laboratory and field materials. Virus suspension in EDTA blood was reconstituted in the laboratory and spotted on 3-MM filter papers. After desiccation, the 3-MM filter papers were stored at 4 or 37°C and tested once a month with the real-time UPL PCR. The 3-MM filter papers containing positive dried

blood from Madagascar were stored for 9 months at room temperature (22–25°C) and then tested using conventional and King and UPL real-time PCRs. They were tested just after collection and then 9 months later after storage at ambient temperature.

Comparison and evaluation of the performances of PCR and virus isolation on 3-MM filter papers

The analytical sensitivity of the PCR was tested by conventional and UPL real-time PCRs on the seven serial dilutions described above, either spotted on 3-MM filter papers or stored in liquid form. The results of these tests were directly compared with the results of virus isolation.

To assess the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the different tests carried out on 3-MM filter papers, paired samples (3-MM filter papers containing dried blood and EDTA blood) collected during three different challenge experiments were used and tested by the King and UPL real-time PCR. Next, the same approach was used on paired samples collected from pigs in an endemic region (Madagascar) or single 3-MM filter paper samples from pigs collected in an infection free area (Côte d'Ivoire).

The relative sensitivity and specificity of the different tests were estimated by TP/(TP+FN)% and TN/(TN+FP)%, respectively, where TP, TN, FP and FN are the numbers of true positives, true negatives, false positives and false negatives in the reference test, respectively. The positive and negative predicted values for a given test were calculated with TP/(TP+FP)% and TN/(TN+FN)%, respectively. For sensitivity, specificity and predictive values, a 95% confidence interval was calculated. Gold standard procedure for the calculation of these test performances was the UPL real-time PCR (Fernández-Pinero et al., 2012) using blood and tissues samples: this test was formerly identified as the most sensitive in our hands compared to conventional and King PCR. The agreement between two tests was determined by the kappa test where k values higher than 0.81 were considered as indicative of very good agreement (Altman, 1991).

Results

Effect of the size of the 3-MM filter paper on the analytical sensitivity of the PCR methods

To test the impact of the size of the piece of 3-MM filter papers on the performances of the test, different sized pieces of 3-MM filter papers containing dried blood were prepared and included in either the conventional or UPL PCRs. The results showed that the conventional PCR is not sensitive to differences in the size of the 3-MM filter paper within the limits of 0.3 and 5 mm² (Fig. 1). With the UPL PCR, C_t values were still detectable on 0.3–6.25 mm² pieces of 3-MM filter paper (data not shown).



Fig. 1. Direct conventional PCR for ASFV detection according to the IP size. PCR products are shown by gel electrophoresis. An expected product of 346 bp was detected with IPs from 0.3 to 3 mm² in size. a: size of Whatman filter paper 0.3 to 6.25 mm²; 1+ positive control; 1-: negative control; L: Ladder.

Detection limit of PCR and virus isolation on 3-MM filter papers containing dried blood

We then determined the end point dilution of the threefold serial dilutions to give a positive PCR amplification signal or virus isolation. The results (summarized in Table 1) showed only one log reduction in analytical sensitivity when 1.25-mm² 3-MM filter papers were used compared to standard biological materials in the two different PCR methods tested for ASFV detection.

Performance of ASFV detection methods on 3-MM filter papers containing dried blood from experimentally infected animals

ASFV detection was performed on 3-MM filter papers, and the results are summarized in Table 2. The observed sensitivity was 65.2% for King real-time PCR, 78.9% for conventional PCR, 95.7% for UPL PCR and 95.7% for virus

isolation. The observed specificity for all tests on filter papers containing dried blood was excellent (100%). The positive predictive value (PPV) was 100% while the negative predictive values (NPV) ranged from 87.5% to 98.2%. When considering these parameters and the values of Kappa test, the best 'fit for purpose' tests were in decreasing order: virus isolation, real-time UPL PCR, conventional PCR and real-time King PCR (see Table 2). In addition, the 3-MM filter papers used in direct conventional or real-time UPL PCRs proved to be able to detect circulation of the virus genome as early after infection as conventional samples. The virus was detected at 3–5 days post-challenge and throughout the clinical phase.

Performance of ASFV detection methods on 3-MM filter papers containing dried blood collected from animals in the field

A similar approach was used on field samples collected in Madagascar, an endemically infected country, and in Côte d'Ivoire, which has been free of the disease for more than 10 years. The results are summarized in Table 3. Again, the real-time UPL and conventional PCRs performed better. Virus isolation was not performed on field samples because not enough material was available.

UPL PCR robustness

In the previous sections, the UPL PCR was shown to have the best performances with 3-MM filter papers containing dried blood. We then checked the robustness of this assay. The robustness test consisted of repeated tests on the same 3-MM filter papers spotted with serial dilutions of the virus, sampled at different times and tested randomly on two real-time PCR machines. All ASFV-positive 3-MM

Table 1. Detection limit of ASFV on 1.25-mm² 3-MM filter papers containing dried blood by direct (no nucleic acid extraction) conventional PCR, direct real-time UPL PCR and virus isolation compared to standard procedures. The virus was not isolated from blood

Estimated virus titres (TCID ₅₀)	Dilution	Detection limit				
		3-MM filter papers containing dried blood			Blood	
		Conventional PCR	UPL PCR (C _t value)	Virus isolation	Conventional PCR	UPL PCR (C _t value)
1 × 10 ^{1.0}	1/3	+	28.8	+	+	27.51
1 × 10 ^{2.0}	1/9	+	32.7	+	+	29.55
1 × 10 ^{3.0}	1/27	+	34.9	+	+	31.48
1 × 10 ^{4.0}	1/81	+	39.4	+	+	34.89
1 × 10 ^{5.0}	1/243	+	39.9	+	+	37.28
1 × 10 ^{6.0}	1/729	+	41.4	+	+	38.90
1 × 10 ^{7.0}	1/2187	–	No C _t	–	+	40.56

+ = detected.

– = non detected.

Table 2. Comparison of test performances for ASFV detection on filter papers containing dried blood collected from experimentally challenged pigs. The positive/negative status of the pig was defined by considering a combination of the experimental treatment administered to the animal and the result of the standard detection procedure on EDTA blood (see bottom of the table for definitions). The results of the different methods used on 3-MM filter papers are shown as a function of this status

Test on filter paper	Conventional PCR		King real-time PCR		UPL real-time PCR		Virus isolation	
	Detected	Undetected	Detected	Undetected	Detected	Undetected	Detected	Undetected
Pig status								
Positive ^a	54	15	45	24	60	3	66	3
Uninfected (negative) ^b	0	100	0	100	0	100	0	88
Sensitivity	78.3%		65.2%		95.7%		95.7%	
	[95% CI, 68.4–88.2]		[95% CI, 53.2–76.7]		[95% CI, 90.8–100]		[95% CI, 90.2–100]	
Specificity	100%		100%		100%		100%	
	[95% CI, 99.1–100]		[95% CI, 99.2–100]		[95% CI, 99.2–100]		[95% CI, 99.4–100]	
Positive predictive value	100%		100%		100%		100%	
	[95% CI, 99.1–100]		[95% CI, 98.9–100]		[95% CI, 99.2–100]		[95% CI, 99.2–100]	
Negative predictive value	91.8%		87.5%		98.2%		98.7%	
	[95% CI, 87.2–95.9]		[95% CI, 82.2–92.3]		[95% CI, 96.1–100]		[95% CI, 92.9–100]	
K value (Kappa test)	0.90		0.72		0.98		0.98	

^aInfected pigs with at least one positive result in standard testing of EDTA-blood samples.

^bInfected pigs but PCR negative by standard detection procedure and control animals not infected considered as true negative.

Table 3. ASFV detection performance using field samples, 3-MM filter papers compared to standard detection procedures. The pig status is characterized both by the origin of the pigs (infected versus infection free regions, i.e. Madagascar versus Côte d'Ivoire) and the result of conventional and real-time PCRs obtained on the corresponding tissue samples. The results for the evaluation of the different methods used for 3-MM filter papers are shown as a function of this status

Test on filter papers	Conventional PCR		King real-time PCR		UPL real-time PCR	
	Detected	Undetected	Detected	Undetected	Detected	Undetected
Pig status						
Infected ^a	14	2	12	4	15	1
Uninfected ^b	0	75	0	75	0	421
Sensitivity	87.5%		75%		93.8%	
	[95% CI, 70.9–100]		[95% CI, 53.3–96.7]		[95% CI, 81.2–100]	
Specificity	100%		100%		100%	
	[95% CI, 99.1–100.0]		[95% CI, 95.3–100]		[95% CI, 99.3–100.0]	
Positive predictive value	100%		100%		100%	
	[95% CI, 78.5–100]		[95% CI, 80.6–100]		[95% CI, 80.6–100]	
Negative predictive value	97.4%		94.3%		99.8%	
	[95% CI, 93.8–100]		[95% CI, 87.6–98]		[95% CI, 99.4–100]	
Kappa test	0.92		0.89		0.98	

^aPigs with positive PCR on tissue samples, samples considered as true positive.

^bPigs from an infected region but PCR negative or pigs from an infection free region.

filter papers were repeatedly detected by the UPL PCR assay in the two independent runs performed, while negative 3-MM filter papers remained undetected (data not shown).

Antibody detection

A limited comparative study of the capacity of 3-MM filter papers to preserve antibodies for subsequent detection by ELISA was carried out. Paired samples of sera/3-MM filter papers containing dried blood collected from experimentally challenged pigs were used, as described above. Although only small numbers of samples were tested, the

performances of the ELISA on 3-MM filter papers are encouraging compared to results generated on corresponding sera. The sensitivity, specificity, PPV and NPV for antibody detection on 3-MM filter papers compared to sera are summarized in Table 4. Except for one positive serum, all 3-MM filter papers gave similar results. The Kappa test showed very good agreement between the two methods.

Thermal stability of 3-MM filter papers

The virus suspended in EDTA blood and dried on 3-MM filter papers was still detectable after one and 2 months of storage at 4 or 37°C as shown by the UPL PCR test.

Table 4. Comparison of filter papers containing dried blood and sera for ASF-specific antibody detection by ELISA

	Sera		Total
	Negative	Positive	
Filter papers			
Negative	30	1	31
Positive	0	15	15
Total	30	16	46
Sensitivity	93.8% [95% CI, 71.7–98.9]		
Specificity	100% [95% CI, 88.6–100]		
Positive predictive value	100% [95% CI, 79.8–100]		
Negative predictive value	96.8% [95% CI, 83.8–99.4]		
Kappa	0.95		

In addition, virus collected on slaughtered pigs in Madagascar and dried on 3-MM filter papers and initially found to be positive remained positive for up to 9 months at 22–25°C when checked by conventional, King and UPL real-time PCRs.

Discussion

In this study, the performance of Whatman 3-MM filter papers for the collection of blood samples and their storage at room temperature (>22°C) for long periods of time was investigated with currently used diagnostic procedures for African swine fever. One originality of this study was the detection of ASFV specific antibodies from blood dried on 3-MM filter papers using a commercial ELISA kit originally designed for serum. Our results suggest that 3-MM filter papers can be used for antibody detection by ELISA as previously shown for other diseases and other species (Bluet et al., 2003; Joseph and McInnes, 2010; Curry et al., 2011). The agreement between the sera and the 3-MM filter papers in the ELISA test was very good although a slight reduction in sensitivity was observed. The only conflicting result (positive serum and negative 3-MM filter paper) concerned the paired samples collected 23 days after the experimental challenge, suggesting that low antibody concentrations may not be detected in 3-MM filter papers compared to sera. This reduction in sensitivity needs to be assessed more precisely on a larger number of field samples in the future. However, assuming the reduction in sensitivity is confirmed, one possible solution would be to increase the targeted number of samples collected in sero-surveillance programs to find a balance between the need for more tests but a simpler procedure to collect and store the samples in the field. As the procedure for collecting blood on 3-MM filter paper is easy (blood droplets obtained by scarifying the skin of the pig's ear), considering the advantage of 3-MM filter paper for long-term storage of biological material at ambient temperature, this should not be a major disad-

vantage. Using 3-MM filter papers instead of sera for serological testing in the laboratory is less convenient. Indeed as indicated in the Material and Methods section, 3-MM filter papers stored at room temperature have to be eluted for several minutes or hours by stirring in the appropriate buffer to allow the recovery of antibodies.

Fortunately, this drawback does not exist for molecular techniques which, after serological testing, are the most popular diagnostic procedures used for rapid identification of animal and human diseases. In this study, it was even shown that 3-MM filter papers have an outstanding advantage compared to conventional biological materials, as extraction of nucleic acids is not required. Thus, to be able to perform direct conventional or real-time PCRs implies a considerable reduction in both the time required for molecular diagnosis and the cost. Also, another potential advantage is the reduction of potential contaminations during sample process. In all circumstances, very high specificity was observed with the different molecular tests evaluated in this study, whereas sensitivity was more variable. Thus, the first real-time PCR (King et al., 2003) run for ASFV detection was less sensitive than the other molecular tests. Indeed, this study and a previous one by Michaud et al. (2007) showed that the likelihood a validated test for conventional biological materials will not give satisfactory results on 3-MM filter papers is even higher. Viral DNA was detected easily using real-time PCR (Brune et al., 2013). It was possible to use Whatman 3-MM filter papers collected as early as 3–5 days after infection in direct conventional or real-time PCRs for early detection of ASFV genome in the three different experiments.

The recent UPL procedure was shown to be more sensitive than the reference test designed by King et al. (2003) (Fernández-Pinero et al., 2012). This difference was not only apparent on 3-MM filter papers but also on tissues or blood (data not shown). The UPL method uses a commercial Universal Probe Library (UPL) probe combined with a specifically designed primer set to amplify an ASFV DNA fragment within the VP72 coding genome region. It is also cheaper than the Taqman technology and, combined with direct detection on filter papers, is probably more suitable for laboratories with a limited budget. Whatman 3-MM filter papers are not only cheap but are also suitable for large-scale surveillance in remote rural and tropical areas. In this study, ASFV continued to be detected for at least 9 months at ambient temperature (22–25°C), and it is likely that even higher temperatures will not interfere with the preservation of the material, as previously shown by other authors (Michaud et al., 2007; Utterthal et al., 2013). This study showed that samples originally diagnosed as positive were still positive after being stored for 2 months at 37°C. However, a slight reduction in the analytical sensitivity of PCR was observed for 3-MM filter papers compared to standard

procedures on tissue samples. This may be due to the reduced amounts of viral DNA present on filter papers containing dried blood, or alternatively, to the presence of PCR inhibitors. PCR inhibitors in blood have been identified and include natural blood components, mainly heme (Akane et al., 1994) and leucocyte DNA (Morata et al., 1998). To prevent inhibitory effects, we suggest using smaller pieces of filter paper for negative tests. In this study, the size of the 3-MM filter papers had little influence on analytical sensitivity, underlining the robustness of the method. From our results, we suggest a 2-cm² piece is the most convenient. To control PCR inhibiting factors, the parallel detection of an internal control, for example, a house-keeping gene from pig blood would be possible. As laboratories located in remote areas may find it difficult to acquire punchers to punch out standard pieces of 3-MM filter paper for the methods used in this study, which are less prone to variations in size, common laboratory consumables such as Petri dishes and sterile scalpel blades could be used to prepare small pieces of 3-MM filter paper thus limiting the risk of cross-contamination between samples.

Interestingly, another new approach we tested in this study was the detection of ASFV through isolation of the virus from the blood of infected animals dried on 3-MM filter papers. The results were comparable with those of direct conventional and real-time PCRs, even on 3-MM filter papers conserved at 37°C for 2 months. Even higher temperatures may be encountered in some tropical countries. However, it is important to note that in our case, filter papers conserved at 37°C for more than 2 months could not be satisfactorily eluted for subsequent virus isolation. Therefore, keeping 3-MM filter papers at temperatures higher than 37°C or for more than 2 months should be avoided or at least, assessed before implementation in the field. This means that in countries where the temperature can exceed 37°C, the use of a closed box to limit overheating should be considered. Direct isolation of virus from filter papers can only be achieved with filter papers such as 3-MM filter papers which, unlike FTA cards for instance, do not contain impregnated matrix for nucleic acid preservation. Whatman 3-MM filter papers do not inactivate the material and are therefore less suitable for biosafety shipment of the material. However, in some circumstances, being able to isolate the virus may be necessary to better characterize the virus and to provide absolute proof that it is the cause of an outbreak.

In summary, Whatman 3-MM filter papers are a cheap, simple and rapid support for blood collection, preservation and ASF disease diagnosis either by ELISA, direct conventional and real-time PCRs, and virus isolation. Other advantages of 3-MM filter paper strips include the smaller volume of blood that is required and the ability to collect a large number of samples (Dubay et al., 2006). Further,

work is required to establish the robustness of the assay in large-scale filter paper sampling in an endemic country. The Whatman 3-MM filter papers used in this study are less expensive and although they are not specifically designed for the preservation of nucleic acids, they proved to be efficient in this study and others (Kallish et al., 2002). Whatman 3-MM filter papers can therefore be used as a multivalent support for multipurpose diagnosis under tropical conditions.

Acknowledgements

This study was partially funded by the International Foundation for Science grants n B/4612-1 and the 7th European Framework programme FP7-KBBE-2007-1, ASFrisk (no. 211691) and ASFforce (no. 311931).

References

- Abdelrahman, E. M., D. Udochow, T. C. Haeder, and H. M. Hafner, 2011: The use of FTA filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *J. Virol. Methods* 179, 120–122.
- Agüero, M., J. Fernandez, L. J. Romero, C. Sanchez Mascaraque, S. Belak, M. Arias, and J. M. Sanchez-Vizcaino, 2003: Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4431–4434.
- Agüero, M., J. Fernandez, L. J. Romero, M. J. Zamora, C. Sánchez, S. Belak, M. Arias, and J. M. Sánchez-Vizcaino, 2004: A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet. Res.* 35, 551–563.
- Akane, A., K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi, and K. Kimura, 1994: Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.* 39, 362–372.
- Altman, D. G., 1991: *Practical Statistics for Medical Research*, pp. 606. Chapman and Hall, London.
- Arias, M., J. M. Sanchez-Vizcaino, A. Morilla, K. J. Yoon, and J. J. Zimmerman, 2002: African swine fever eradication: the Spanish model. In: *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Vol. 1, pp. 133–139. Iowa State Press, Ames.
- Babalola, O. O., B. O. Oluogun, D. O. Oluwayoba, L. F. Ijaghona, G. O. Ayode, and S. A. Aghade, 2007: Analysis and evaluation of mortality losses of the 2001 African swine fever outbreak, Ibadan, Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 39, 513–542.
- Baret, T., E. Albira, Y. Lelochan, F. Mader, H. Guimote, J. Plans Duran, and P. Vannier, 1992: Report on the first outbreak of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. *Ann. Rech. Vet.* 23, 161–166. Erratum in: *Ann. Rech. Vet.* 1992;23:33.
- Ratto, A. P., R. S. Portugal, R. J. Nis, C. Cartaxoira, F. Boimaz, L. K. Dixon, A. Leitao, and C. Martins, 2006: Development of a

- nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Oemphiodromus ornatus*. *Arch. Virol.* 151, 819–826.
- Behets, P., M. Kachurukwa, M. Pappaisarous, T. A. Green, R. W. Ryder, V. Bamer, J. R. Gange, W. H. Hamman, and T. C. Quinn, 1992: Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1179–1182.
- Braun, U. C., M. V. Johansen, H. A. Ngori, T. R. Rasmussen, J. Nielsen, and A. Utzinger, 2013: Detection of African swine fever virus DNA in blood samples stored on FTA cards from asymptomatic pigs in Mbeya Region, Tanzania. *Transbound. Emerg. Dis.* doi:10.1111/tbed.12074.
- Curry, P. S., R. T. Elkin, M. Campbell, K. Nielsen, W. Hutchins, C. Ribble, and S. J. Katz, 2011: Filter-paper blood samples for ELISA detection of Brucella antibodies in caribou. *J. Wildl. Dis.* 47, 12–20.
- De Saet, R. L., Y. Nar, A. Abdallah, H. Krüning, H. S. El Maharak, S. A. Ibrahim, B. Van Den Hoogen, J. Groen, and A. D. Osterhaus, 2002: Combination of reverse transcription PCR analysis and immunoglobulin M detection on filter paper blood samples allows diagnostic and epidemiological studies of measles. *J. Clin. Microbiol.* 39, 270–273.
- Dietze, K., D. Beltrán-Alcruz, S. Khromenko, B. Seck, J. Pinto, A. Diallo, C. Larnier, J. Lubresh and V. Martin, 2012: African Swine Fever (ASF) Recent developments - timely updates. Focus on No. 6, Rome, FAO. Available at <http://www.fao.org/docrep/006/ap372ap372e.pdf>. (accessed 30 September 2012).
- Dixon, L. K., J. M. Escribano, C. Martins, D. L. Kock, M. L. Salas, and P. J. Wilkinson, 2005: *Afarviridae*. In: Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (eds), *Virus Taxonomy*. VIIIth Report of the ICTV, pp. 135–143. Elsevier/Academic Press, London.
- Dubey, S. A., S. S. Rosenstock, D. E. Stallknecht, and J. C. deVos Jr., 2006: Determining prevalence of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses in male deer in Arizona (USA) using whole blood dried on paper strips compared to serum analysis. *J. Wildl. Dis.* 42, 159–163.
- Fernández-Pinero, J., C. Gallardo, M. Ilizalde, A. Robles, C. Gómez, R. Bishop, L. Heath, E. Couacy-Hymann, F. O. Fajana, V. Pelayo, A. Soler, and M. Arias, 2013: Molecular diagnosis of African swine fever by a new real-time PCR using Universal Probe Library. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 48–58.
- Gallardo, C., J. Fernández-Pinero, V. Pelayo, I. Gansov, I. Markowska-Daniel, G. Fridolfson, R. Nieto, P. Fernández-Pacheco, S. Bokhan, O. Nevilka, Z. Draháňová, C. Pérez, A. Soler, D. Kabanov, and M. Arias, 2014: Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, eastern and central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1544–1547.
- Helfand, B. F., H. L. Kuperling, I. Williams, A. Murray, J. Mei, C. Montaliello, J. Janszky, and W. J. Bollini, 2001: Comparative detection of measles and rubella IgM and IgG derived from filter paper blood and serum samples. *J. Med. Virol.* 65, 751–757.
- Hutchings, G. H., and N. P. Ferris, 2006: Indirect sandwich ELISA for antigen detection of African swine fever virus: comparison of polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods* 131, 213–217.
- Huet, E., S. Chevallier, M. Elst, A. Tournier, P. Blanquart, and E. Albina, 2005: Porcine reproductive and respiratory syndrome antibody detection on filter discs. *Rev. Sci. Tech.* 22, 2077–2083.
- Johannesson, A., M. Trosid, and A. Calmy, 2009: Dried blood spots can expand access to virological monitoring of HIV treatment in resource-limited settings. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1126–1129.
- Joseph, H. M., and W. Mahmood, 2010: Applicability of the filter paper technique for detection of antifilarial IgG4 Antibodies using the Sm14 Filariasis CEILISA. *J. Parasitol. Res.* 2010, 6.
- Kailash, U., S. Hedau, V. Gopalakrishna, S. Katiyar, and B. C. Das, 2002: A simple 'paper arena' method for dry collection, transport and storage of cervical cytological specimens for rapid screening of HPV infection by PCR. *J. Med. Microbiol.* 51, 606–610.
- King, D. P., S. M. Reid, G. H. Hutchings, S. S. Grierson, P. J. Wilkinson, L. K. Dixon, A. D. Barton, and T. W. Drew, 2002: Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods* 107, 53–61.
- Le Potier, M.-F., and C. Marcé, 2013: Nouvelle avancée de la peste porcine africaine aux frontières de l'Europe: la Biélorussie atteinte. African Swine Fever is in the vicinity of Europe: first case notified in Belarus. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 38, 23–24.
- Malmquist, W. A., and D. Hay, 1986: Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.* 21, 104–108.
- Michaud, V., L. Dixon, L. Romero, M.-F. Le Potier, F. Roger, and E. Albina, 2004: PCR directe pour la détection du génome du virus de la peste porcine africaine à partir de prélèvements de sang sur bandeau. *Journées Recherche Porcine* 36, 323–326.
- Michaud, V., P. Gél, O. Kwiatk, S. Proust, L. Dixon, L. Romero, M.-F. Le Potier, M. Arias, E. Couacy-Hymann, F. Roger, G. Libeau, and E. Albina, 2007: Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *J. Virol. Methods* 146, 257–263.
- Minata, P., M. I. Queipo-Ortuno, and J. de Dios Colmenero, 1998: Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2445–2446.
- OIE (World Organisation for Animal Health), 2014: Report archive. Available at http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/DiseaseInformation/reportarchive (accessed 24 January 2014).

- Perreth, M. L., and D. Nyakabanda, 2000: Recognising African Swine Fever: A Field Manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Pitcovski, J., E. Shmush, S. Krupel, and N. Levi, 1999: Storage of viruses on filter paper for genetic analysis. *J. Virol. Methods* 83, 21–26.
- Rahimi, P., A. Seifzadeh, J. Ashrafi-Nia, R. Edalat, M. Alameddine, M. Masoumi, S. Masoumi, and K. Azadmanesh, 2010: Emergence of African swine fever virus, Northwestern Iran, *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1946–1948.
- Kiddell, M. A., G. B. Symes, J. A. Leydon, and H. A. Kelly, 2003: Dried venous blood samples for the detection and quantification of measles IgG using a commercial enzyme immunoassay. *Bull. World Health Organ.* 81, 701–707.
- Rowlands, R. J., V. Michaud, L. Heath, G. Hutchings, C. Oura, W. Voolso, R. Dzakula, T. Onashvili, E. Albina, and L. K. Dixon, 2008: African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1870–1874.
- Saiger, L., M. Ackermann, C. Mettenes, and U. Eiken, 1992: Rapid and biologically safe diagnosis of African swine fever virus. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1–8.
- Tignon, M., C. Gallardo, C. Jacquot, E. Huet, Y. Van der Stede, D. Kolbasov, G. M. De Mia, M.-F. LePortier, R. P. Bishop, M. Arias, and F. Koenen, 2011: Development and intra-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J. Virol. Methods* 178, 161–170.
- Ustenthal, A., U. C. Braas, H. A. Ngweni, T. B. Rasmussen, J. Nielsen, and M. V. Johansen, 2013: ASFV in Tanzania: asymptomatic pigs harbor virus of molecular similarity to Georgia 2007. *Vet. Microbiol.* 168, 173–178.
- Vidal, M. L., M. Sôane, J. Henkel, U. Bilanowski, J. V. Costa, and A. G. Oliva, 1997: A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of African swine fever virus antigens and antibodies. *J. Virol. Methods* 66, 211–218.
- Vitek, S., I. Stojanovic, B. Durkovic, W. Rossmann, and D. Paton, 2001: Storage of bovine viral diarrhoea virus samples on filter paper and detection of viral RNA by a RT-PCR method. *J. Virol. Methods* 92, 19–22.
- Zak, L., M. V. Roca, G. R. Ratti, A. Zak, B. A. French, Z. Lu, G. F. Kutish, J. G. Neill, J. D. Callahan, W. M. Nelson, and D. L. Rock, 2003: Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 43, 112–113.

ANNEXE II

Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of African Swine Fever Virus: Proposal for a New Classification and Molecular Dating of the Virus

Vincent Michaud^{1,2,3*}, Tantely Randriamparany⁴, Emmanuel Albina^{1,2}

¹ CIRAD, UMR OMAR, Montpellier, France, ² CIRAD, UMR OMAR, Petit-Bourg, Guadeloupe, France, ³ INRA, UMRI1309 OMAR, Montpellier, France, ⁴ Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire, Antananarivo, Madagascar

Abstract

African swine fever (ASF) is a highly lethal disease of domestic pigs caused by the only known DNA arbovirus. It was first described in Kenya in 1921 and since then many isolates have been collected worldwide. However, although several phylogenetic studies have been carried out to understand the relationships between the isolates, no molecular dating analyses have been achieved so far. In this paper, comprehensive phylogenetic reconstructions were made using newly generated, publicly available sequences of hundreds of ASFV isolates from the past 70 years. Analyses focused on B646L, CP204L, and E183L genes from 356, 251, and 123 isolates, respectively. Phylogenetic analyses were achieved using maximum likelihood and Bayesian coalescence methods. A new lineage-based nomenclature is proposed to designate 35 different clusters. In addition, dating of ASFV origin was carried out from the molecular data sets. To avoid bias, diversity due to positive selection or recombination events was neutralized. The molecular clock analyses revealed that ASFV strains currently circulating have evolved over 300 years, with a time to the most recent common ancestor (TMRCA) in the early 18th century.

Citation: Michaud V, Randriamparany T, Albina E (2013) Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of African Swine Fever Virus: Proposal for a New Classification and Molecular Dating of the Virus. PLoS ONE 8(7): e69662. doi:10.1371/journal.pone.0069662

Editor: Matthew J. Donlin, Saint Louis University, United States of America

Received: January 21, 2013; **Accepted:** June 11, 2013; **Published:** July 25, 2013

Copyright: © 2013 Michaud et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was financially supported by the Wellcome Trust (071018Z, 10Z, 1140056/04) (<http://www.wellcome.ac.uk/>) and the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) (http://cordis.europa.eu/fp7/home_en.html) under grant agreement 6086–2116091–ASF08K, partially funded by the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2011–2013) (http://cordis.europa.eu/project/view/105076_en.html) under grant agreement 6086–2116091–ASF08K, and also partially funded by the European Union through the Network of Excellence EPIC08K (contract FP6-0016216) (<http://www.epic08k-eu.net/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vincent.michaud@cirad.fr

Introduction

African swine fever (ASF) is an infectious and contagious hemorrhagic disease of domestic pigs [1]. It is highly lethal, causing up to 100% mortality in naive animals, with devastating effects on pig production and animal trade, and major economic losses in affected countries [2]. First described by Montgomery in 1921 in Kenya [3], ASF has then been observed in most sub-Saharan countries, where it has often become endemic [4]. From Africa, it reached Europe, i.e. Portugal in 1957 and again in 1960, from where it colonized Spain, France, and Belgium. From there, the virus reached Latin America during the 70s–80s. In Europe, ASF remained endemic in the Iberian Peninsula up to the middle of the 90s and the disease is still present in Sardinia [2]. Recently, it has been re-introduced on the borders of Europe, in Georgia in 2007 [5] and then it extended to the Caucasus and Russia [6]. No vaccine is available and disease control is based only on quarantine and animal slaughtering. In this context, its great ability to spread makes the ASF virus one of the most important infectious threats for the domestic pig industry worldwide. African swine fever virus (ASFV) is a large icosahedral and enveloped dsDNA virus; it is the only recognized DNA arbovirus and also the only member of the *Afipoviridae* family and *Afivirus* genus [7]. However, ASFV shares characteristics with the other members of the *Nucleo-Cytoplasmic*

Large DNA virus family [8], suggesting that they all may have had a common ancestor [9], [10].

ASFV is believed to be an ancestral virus of soft tick (*Ornithodoros* genus) [11] infecting wild swine like warthogs (*Phacochoera fuscus*), bushpigs (*Potamochoerus porcus*), and giant forest hogs (*Hylochoerus meinertzhageni*) with asymptomatic effects. The virus replicates in ticks and is then transmitted to wild swine during blood feeding; wildlife are considered as the natural reservoir of the virus. The virus can persist in ticks for years, even in quiescent ticks waiting for host feeding. The sylvatic cycle of ASFV established between ticks and wild swine can be maintained indefinitely. This cycle allows the maintenance of virus circulation and probably enables the persistence of ancient viruses and the emergence of new variants. At the laboratory level, virus variants were initially characterized by genome size and enzymatic restriction profiles [12]. A high level of variability is observed mainly within the 35 kb at the 3' end and the 15 kb at the 5' end of the genome (170–190 kb) [13], [12], [14]. These two regions contain the multigene families (*BGLF*), which vary in number between isolates and enable virus variability by gene homologous recombination. Moreover, variability is also generated by a change in the number of amino-acid repeats in 14 proteins, including the envelope protein p54 encoded by the *E183L* gene [15]. More recently, gene sequencing and analysis were introduced to increase differentiation between

ASFV isolates collected worldwide. The first group [16] used phylogenetic reconstructions based on the partial sequence of B646L gene coding for the major viral protein (MCP) VP72. Their trees showed a very close relationship between West African, European, and South American isolates, all clustered in genotype 1. Despite more than 50 years of circulation in three continents, the limited accumulation of genetic changes has made it impossible to discriminate isolates within genotype 1. In contrast, eastern and southern African isolates are more diverse and segregate into 21 additional genotypes [16], [17], [18]. This could be explained by the fact that these viruses are propagated within a sylvatic cycle, in contrast to viruses of genotype 1 that mainly replicate in domestic pigs, although they were secondarily detected in European soft ticks *O. oenops* and wild boars in Spain and Portugal. This supports the assumption that the virus diversity may be generated during the sylvatic cycle of the virus [19]. Other genes or genome sequences have been used successfully to discriminate ASFV isolates collected at a regional level. For instance, the B602L gene from the central variable region of the genome (CVR, coding p34 protein), the CP204L gene (coding the phosphoprotein P32), and the E183L gene (envelope protein p54) have been used to further split the local isolates [20], [21], [5].

The aim of this study was to reassess the phylogenetic reconstructions and nomenclature of ASFV by including recent sequences and to explore the evolution of the virus based on a comprehensive analysis of the available sequence data sets. Accordingly, three genes were targeted, all of them being the most sequenced and uploaded in public databases. The B646L, E183L, and CP204L genes belong to the most conserved central part of the genome and encode the structural virus proteins VP72 (capsid), p54 (membrane protein), and p32 (membrane protein), respectively. They are also known to generate antibodies in pig [22]. The origin and the evolution of the virus were inferred from these three genes.

Materials and Methods

Data Set

A large collection of ASFV isolates were included (Table S1). The majority of ASFV sequences used were downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and a CISA-INIA web site data bank (<http://www.cisa.inia.es/asfv/>). Additional sequences of Madagascar isolates were generated after virus isolation on pig alveolar macrophages from pigs sampled during outbreaks between 1998 and 2008. These sequences are interesting for the study of ASFV evolution since they are considered to have derived from a unique introduction of the virus in 1998: twenty-one samples were selected to cover the whole territory and the 1998–2008 period. PCRs were performed using the following primers: VP72-d (5'-GGCACAAAGTTGGGACATGT-3') and VP72-U (5'-GTACTGTAAAGCAGCAGCACAG-3') [16], E183L for p54 (5'-GGTTGGTTTTCAAAATGTTGGCGAAGGTA-3') and E183Lrev-p54 (5'-CGATAAAATTCGTGAATTTCAATTGGGCACACAG-3') and p30/32-P1 (5'-TG CGAAGCATACATAAGTTG-3') and p30/32-P2 (5'-ATTT TGCTGTTTATGAATCC-3') [5] for the amplification of B646L, E183L, and CP204L genes, respectively. PCR products were cloned in *E. coli*, and sequences from these clones were generated by a private company (Cogenics, France). Sites with mutations were particularly checked for sequencing errors: only bases confirmed by two-direction reading were retained as mutations. In all, the analyses were performed on 356 sequences (299 nt long), 251 sequences (186 nt long), and 123 sequences (543 nt long) for B646L, E183L, and CP204L genes, respectively.

Phylogenetic Inference

Sequence analysis. Sequences were aligned by ClustalW with default parameters and then scrutinized and edited using Mega version 5 software [23]. From the multiple sequence alignments, an index of substitution saturation to estimate the degree of sequence information was calculated using Dnab software [24]. DNA polymorphism was also analyzed. The site diversity between two sequences (π) and the number of segregating sites (i.e. the number of sites where one or several substitutions occurred) were obtained by DnaSP version 5 software [25]. In the segregating sites, the ratio of transitions and transversions was assessed. The average number of nucleotide differences (δ) between two sequences was also determined. All this information was used to check the quality of the sequences.

Test for recombination. The presence of sequence recombination events in the data set was assessed in the multiple alignments with RDP3 package version 3 [26] using the default setting for all recombination tests applied on linear sequences (RDP [27], GENECONV [28], MAXCHI [29], BOOTSCAN/RESCAN [30], and SISCAN [31]).

Phylogenetic reconstruction. Maximum likelihood reconstructions [32] generating trees that best fit the evolution of a set of sequences through a probabilistic model of evolution were done using TREEFINDER version March 2011 software [33]. The evolution model was selected according to the Akaike information criterion (AIC) [34], the corrected AIC (AICc) [35], and Bayesian Information Criterion (BIC) [36] with a number of gamma rate categories fixed at 5. The consensus model given by the three information criteria or alternatively, the simplest model, was selected for the reconstruction. Thus, the B646L tree was constructed under HKY+ Γ_4 model [37], [38]. For E183L and CP204L, HKY+ Γ_4 and HKY on the one hand and HKY+ Γ_4 and TN+ Γ_4 models on the other hand were selected. The most complex model, GTR [39], was also systematically included and compared with the others. All the reconstructions were done on 1,000 replicates and bootstraps were approximated using the Expected-Likelihood Weights defined by Strimmer and Rambaut (2002) [40] applied on local rearrangements (LR-ELW) as implemented in TREEFINDER.

Bayesian inference phylogeny was performed using Monte Carlo Markov Chain (MCMC) implemented in MrBayes version 3.1 software [41], [42]. According to the best fit models proposed by TREEFINDER, MrBayes was set with HKY+ Γ_4 , HKY and HKY+ Γ_4 , and HKY+ Γ_4 for B646L, E183L, and CP204L, respectively. The GTR model was also used for each gene. MCMC was run for a maximum of 10 million trees or alternatively when the run reached stationarity as measured by a standard deviation of split frequencies either becoming lower than 0.01 or fluctuating randomly above 0.01 for at least 300,000 generated trees. Consensus trees were generated after having discarded the first 25% of the MCMC burn-in phase.

Tree congruence with data sets was tested by submitting them to the statistical test ELW [40] implemented in TREEFINDER. The tree selected for each gene was the one with the highest ELW score.

Since ASFV is the only member of the *Asfarviridae* family, 37 outgroup viruses for tree rooting were selected in the closest related DNA virus families, the NCLDV's [43], [44], [45]. Because of the high level of nucleotide divergence, multiple sequence alignments were done on the complete amino-acid sequences of the major capsid protein of both outgroup viruses and ASFV isolates (equivalent to B646L protein) using Megal software (see File S1). Tree reconstructions were performed on 1,000 replicates using maximum likelihood method set with WAG+G+I+G and

WAG+G+I models using "all sites" and "complete deletion" options, respectively. The topology of the resulting rooted tree was subsequently applied for placing roots on the B646L, E183L, and CP204L trees.

Analysis of selection pressure. Codons under positive selection pressure in DNA coding sequences may evolve faster than the natural evolutionary rate of the virus genome. To avoid bias in the molecular clocking analysis, the selection pressure acting on the targeted genes was assessed. The ratio of non-synonymous (dN) – synonymous substitution (dS) per site (dN/dS ratio) was calculated and the codons under positive selection pressure were identified by using Codeml software implemented in PAML 4 package.

ASFV genotyping. Isolate genotyping was assessed by comparing the genetic distance between all B646L sequences. Average intra- and inter-branch distances were globally compared to determine the strength of cluster segregation. Additionally, a haplotype network of the isolates was constructed using TCS1.21 software to identify relationships between isolates potentially poorly represented by conventional phylogenetic tree reconstruction. Lastly, specific nucleotide signatures of the different ASFV clusters were searched using multiple sequence alignments containing only the 63 unique B646L sequences. The three approaches were finally combined to raise conclusions about ASFV genotyping.

Molecular dating. Two methods were used in parallel and compared to determine the evolutionary rate and the time to the most recent common ancestor (TMRCA) of circulating ASFV isolates. The first was based on the maximum likelihood method Raxml implemented in PAML 4 package [46] and the second on the Bayesian MCMC implemented in BEAST package version 1.6.2 [47]. Codons under positive selection ($dN/dS > 1$) and recombined sequences were removed from the multiple sequence alignments to avoid bias in the substitution rate determination and consequently in the Tmrca estimation. The best fit tree generated in the phylogenetic reconstruction was used to perform Raxml implemented in PAML 4 package, using an evolution model HKY+Γ, for B646L, CP204L, and E183L genes. Strict and relaxed molecular clock hypotheses [48] were used to generate dated trees for all genes. These two trees were individually compared with the tree generated without a clock constraint to accept or reject the molecular clock hypothesis. A likelihood ratio test (LRT) and a χ^2 comparison were performed to support this analysis. For the relaxed molecular clock, branches delimiting the different genotypes were individually relaxed.

All analyses performed with BEAST package were done under an uncorrelated lognormal relaxed clock model. Considering that at least 20% of our sequences were from isolates persisting in wildlife, a constant population size prior was selected. The initial value and the range of substitution rates were estimated from preliminary analyses and entered into the model of evolution. For each gene, analyses of two independent runs of 100 million steps were performed with 1/10,000 trees sampled. MCMC samples were examined using Tracer version 1.4 [49]: the first 25% of samples in the chain were discarded as burn-in phase. Tree consensus was generated using the maximum clade credibility (MCC) tree using Tree Annotator version 1.4.7 [47]. Only posterior probabilities higher than 0.90 are indicated.

Tree visualization. All trees were represented and edited in Fig Tree version 1.3.1 developed by Andrew Rambaut (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Results

Comprehensive Phylogenetic Inference of ASFV Depicts 4 Major Lineages

Before phylogenetic inference, data sets and multiple sequence alignments were thoroughly examined to eliminate misalignments and ensure correct framing of coding sequences. All gaps were considered as missing information to avoid artificial nucleotide divergence. None of the different methods used in RDP5 package identified recombination events in B646L and CP204L sequences. In contrast, several recombination events were detected among E183L sequences. A total of 17 isolates were subsequently removed from the E183L multiple sequence alignments: 16 were Italian isolates (24/Cr/04, 26/Sa/04, 20/Cr/04, 46/Sa/08, 5/Ca/02, 04/Cr/02, 3/Og/08, 1/Sa/03, 46/Ca/08, 25/Na/04, 43/Cg/03, 42/Og/0, 22/Na/04, 23/Cr/04, 41/Og/03 and 36/Sa/05) [50] and one was a South African isolate (RSA/85/1). The recombination events were all identical for Italian isolates (Figure 1). There were no saturated codons in our alignments (DAMBE, $p_{\text{sat}} < 0.05$), thus indicating the genetic information in the data sets was suitable for phylogenetic analyses.

To check the nucleotide composition of the alignments, statistical tests were performed using DnaSP software. The tests gave the number of nucleotide substitutions, the average diversity per site between two sequences (π), and the average nucleotide difference between two sequences (k). The diversity of B646L and CP204L was approximately half that of E183L (Table 1). In addition, E183L showed a clear bias in non-synonymous mutations. Based on the observed nucleotide substitutions, the minimum and the maximum evolutionary rates were also calculated from each multiple alignment (Table 1). We determined the dN/dS of each gene (Table 1) and the amino acids under positive selection in the alignments. This led to removing 6 nt (2 aa: Hist and Thr28) from B646L alignments, 9 nt (3 aa: Glu31, Pro123 and Leu176) from CP204L alignments, and 27 nt (9 aa: Tyr10, Thr23, Asp100, Thr104, Ser122, Pro140, Val142, Glu143 and Ser149) from E183L alignments for subsequent molecular dating analyses.

The outgroup-rooted trees constructed from the multiple sequence alignments of the major capsid protein amino acid sequences of 30 ASFVs and with 37 out-group viruses from the NCLDV family showed that the common ancestor of all these viruses concerns the ASFV group within eastern African isolates, more precisely between the genotype VIII, IX and X on the one hand and genotypes I and the other genotypes on the other hand (Figure 2). Accordingly, the root on all subsequent trees was placed in this position. This reconstruction also shows that the *Africanis* family is rather divergent from the other NCLDV families.

Phylogenetic trees constructed with B646L sequences showed four major lineages (L) (Figure 3): L1 includes the previously described genotypes I, II, XVII, and XVIII, and L2, genotypes III, IV, V, VI, VII, XIX, XX, XXI, and XXII and an ungenotyped isolate (Cro3.5) [51]. L3 includes genotypes VIII, XI, XII, XIII, XV, and XVI and one isolate TAN/08/MAZIMBU, previously included within genotype XV [52]. L4 gathers genotypes IX and X. Interestingly, the NYA/1/2 isolate ascribed to genotype XIV is the only isolate that does not segregate within one of the four lineages. However, the bootstrap value of its branch is $< 70\%$, thus rendering difficult any conclusion about this isolate. Further clustering of the isolates within these four lineages becomes tricky because of the presence of long branches and multifurcation for some isolate groups or sub-lineages. The TCS network analysis showed that conventional phylogenetic reconstruction based on bifurcations may fail to explain the complex relationships between

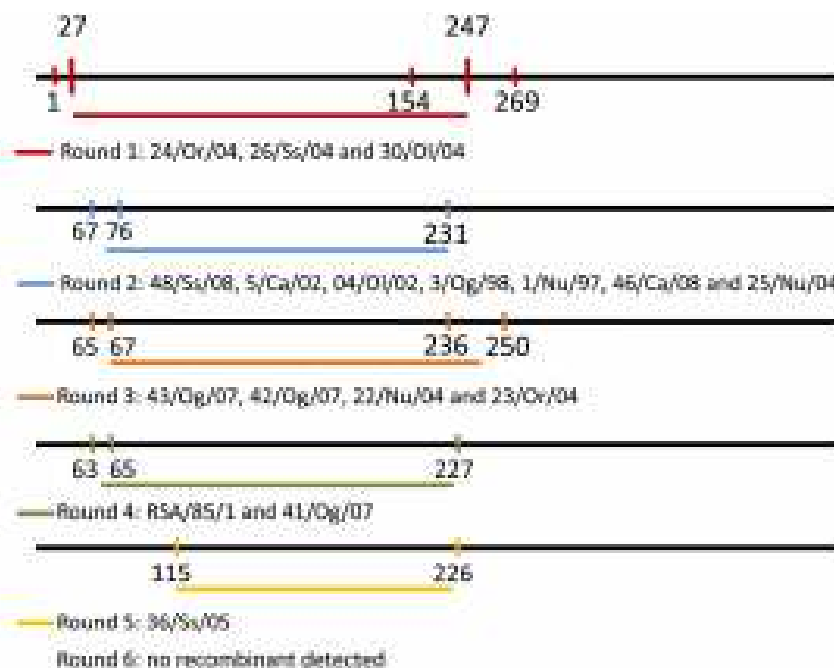


Figure 1. Localization of recombination events detected in E183L sequence alignment. 16 Italian isolates and 1 South African isolate were detected to be recombinant. Italian isolates are linked and because recombination events take place in the same region of the sequence, these isolates have probably emerged from a common ancestor. doi:10.1371/journal.pone.0069662.g001

some isolates (Figure 4). The TCS network confirms the existence of the four lineages that include the same isolates as in bifurcated reconstructions. However, the TCS network seems to better explain the relationships of isolates within a given genotype (e.g. genotype I or N) or between distinct genotypes (e.g. between genotypes III, IV, XIX, XX, and XXI, or between genotypes IX and X). In these cases the pattern of isolate relationships is not strictly bifurcative. Three ways exist between genotype XIX and genotype XX: through genotypes III or IV and/or XXI, which represent internal nodes of the tree, and two ways between genotypes IX and X. Within genotype X, several isolates are internal nodes of the tree, meaning that an isolate can have more than one ancestor, which is inconsistent with bifurcative relationships between isolates. In attempts to refine the characterization of ASFV isolates, the multiple sequence alignments containing 67

unique B646L sequences were searched for specific molecular signatures (Figure 5). Lineage 1 is characterized by 2 nt, and L2, L3, and L4 by 4, 6, and 12 nt, respectively. Genotype XIX, which is not included in one of the four lineages, is characterized by 8 nt (G88, G93, G162, T214, C240, T258, T333, and T348). However, this is the only virus generating this branch, which in addition is not supported by a high bootstrap value (<70%). Therefore, it cannot yet be considered as a fifth lineage. Lineages can be subsequently sub-divided into sub-lineages: 4 for lineage 1, 3 for lineage 2, 7 for lineage 3, and 2 for lineage 4 (Figure 5). Further sub-divisions can be drawn from the molecular signatures (Figure 5) and all are supported by the evolutionary distance matrix, except for some sub-lineages within L1-1, L1-2, L1-3, L2-2, L2-3, and L4-2-2 (Table 2). The average evolutionary distances inside and between all sub-lineages were 0.0023 and 0.055,

Table 1. Summary of the multiple sequence alignments analyses.

Gene	Size, in nt	Polymorphic sites	Syn.	Non Syn.	a	k	dN/dS
B646L	308	110 (37.6%)	62	68	0.09416	33,629	0.233
B646L w/o P	303	-	-	-	-	-	-
E183L	488	262 (54.2%)	88	214	0.27181	24,060	0.266
E183L w/o P	453	-	-	-	-	-	-
CP204L	549	154 (28.2%)	83	88	0.06736	24,588	1.124
CP204L w/o P	524	-	-	-	-	-	-

a: average diversity per site between two sequences (number of nucleotide differences per site between two sequenced); k: average number of nucleotide differences between two sequences, w/o P: without codons under positive selection. doi:10.1371/journal.pone.0069662.t001

Table 2. Estimates of evolutionary distances between ACF lineages and sub-lineages.

[illegible]

[illegible]

The average intra-sub-language diversity was 0.003, whereas the average inter-sub-language was 0.086. In the matrix, all values less than 0.01 are shown in grey boxes; all sub-languages (L1-L10) for the others by a higher diversity, except for some sub-languages within L1, L1-L13, L2-L13, L3-L13, and L4-L13.

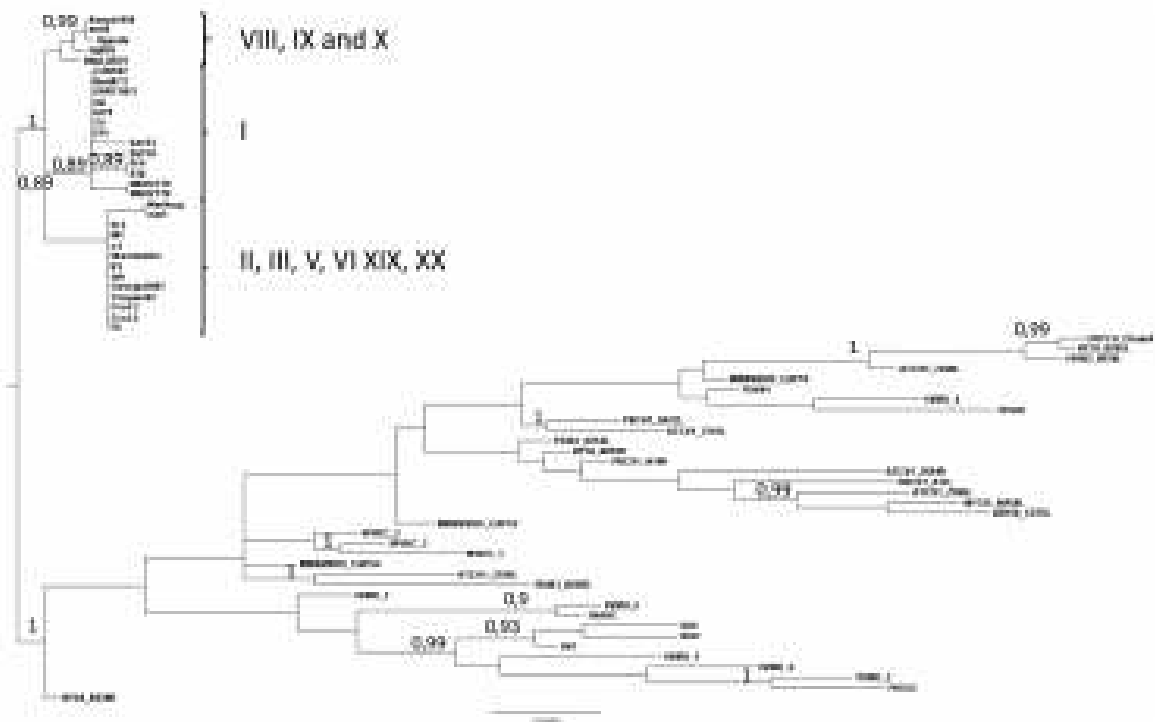


Figure 2. Rooted tree constructed from amino-acid multiple alignments of the major capsid protein of ASFV isolates and four out-grouped viruses. The tree was constructed under a WAG+G+I+F model and maximum likelihood method with 1,000 bootstrap resampling. Numbers indicate the statistical value (Expected-Likelihood Weight) of internal nodes, given in percentages (only numbers above 70% are indicated). The outgroup connects ASFV group by the branch from genotypes VIII (Bwtd207), IX (Ugh03), and X (Kenya1990, kn68 and Uganda) to other genotypes.

doi:10.1371/journal.pone.0069662.g002

respectively. L4 is the most complex lineage, composed of isolates from countries of the Great Lakes Region in Africa (Tanzania, Uganda, Burundi, and Kenya) and divided into several sub-lineages. Sub-lineage L4.2 (including isolates belonging to former genotype N) is the most diverse, with isolates clustering into seven sub-lineages (from L4-2-1 to L4-2-3-3-3). This new classification into lineages almost perfectly overlaps the previous genotype discrimination, with the exception of Cro3.5 isolate, which forms a new cluster within L2 (sub-lineage L2-3-4) and TAN/OR/MAGDMBU isolates, which split from genotype XV to form a new sub-lineage of L3 (L3-7).

The trees generated with CP204L and E183L genes (data not shown) confirmed the existence of four lineages including the same genotypes. However, the E183L gene tree shows some differences in the clustering: SPEC/205 belonged to L1.1.1 lineage with B646L while it moves to L3.2.2.3 (genotype N) with E183L. NYA/1/2, the sole member of former genotype XIV in B646L classification and which segregated between lineages L1, L2, and L3, is placed within lineage L3 in E183L classification. Whether these modifications may be ascribed to inter-gene recombination events remains unclear.

Molecular Dating Leads to a most Recent Common Ancestor of about 300 Years

E183L gene was removed from molecular dating analysis because of the detection of several recombination events and a non-synonymous bias in the gene alignment both due to a strong

positive selection of the immune system on this gene. The strict molecular clock hypothesis, meaning an equal substitution rate for every nucleotide site along the DNA sequences, was rejected for the other two genes by the maximum likelihood analysis performed by Baerani in PAML software suite. In PAML, the branches were individually relaxed in the tree submitted to the analysis. Several trees with different numbers of relaxed branches were tested. The resulting TMRCAs for B646L and CP204L genes were highly variable: from 1597 BC to 760 AD or even undetermined date (because of a tree likelihood value of zero at the beginning of the analysis). This high level of heterogeneity in the TMRCAs using maximum likelihood method led us to select Bayesian approach in the BEAST package. The Bayesian MCMC inference of the two data sets performed with BEAST package showed a satisfactory convergence in the posterior statistic estimates of the substitution rate. Preliminary analyses were used to set the initial value of μ , the parameter of substitution/site/year (data not shown). Accordingly, the prior distribution of this parameter was set from $0.1 \times \mu$ to $1 \times \mu$. Thus, calibrations of molecular clocks were set at 5.3×10^{-4} substitution/site/year [5.3×10^{-4} – 1.4×10^{-3}] for B646L gene and 5.86×10^{-4} [5.36×10^{-4} – 1.99×10^{-3}] for CP204L gene. With these priors, the mean estimates of substitution rates for each gene were finally calculated by BEAST and ranged from 6.6×10^{-4} (CP204L) to 6.9×10^{-4} (B646L) subst/site/year (Table 3). These results are robust in terms of clock model, rate distribution, and population size parameters. The dated trees generated four lineages as



doi:10.1177/0956797603255121.xen

was followed by L1 (104 years), L2 (74 years), and L3 (47 years).

Because the localization of the major capsid protein VP2 in the

reconstructing. In contrast, P4 is an encoding system and the

under positive selection.

where \hat{L} is defined by \hat{L}^2 and \hat{L} are the estimators of

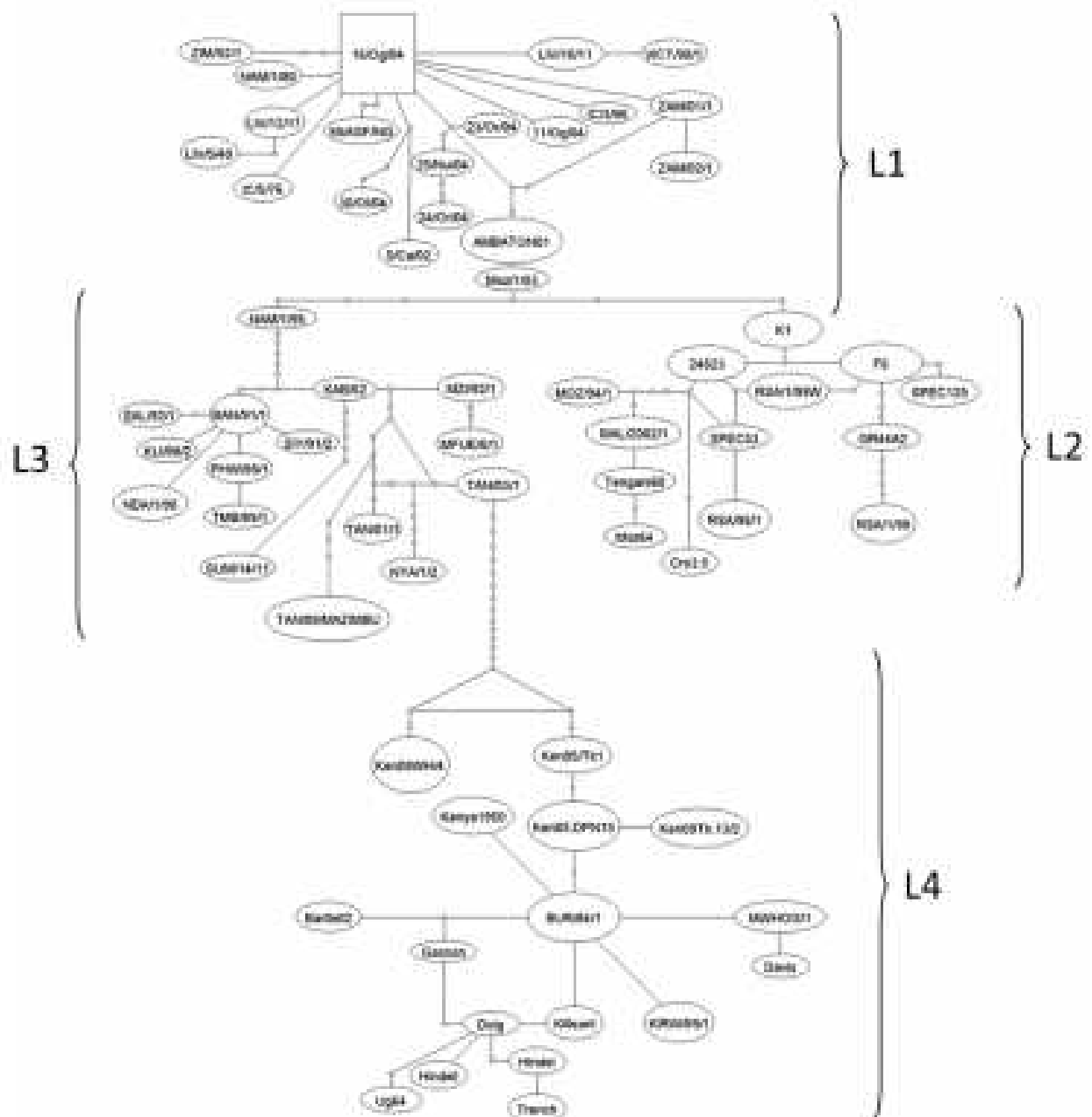


Figure 4. Haplotype network constructed with TCS software. The network shows the same four main lineages that were observed in the bifurcative phylogenetic tree constructed in maximum likelihood under the HKY+ model, but clearly demonstrates that relationships between some ASFV isolates are too complex to be resolved by only bifurcations.
doi:10.1371/journal.pone.0089662.g004

which 3 are not synonymous. Within the L1 lineage, genotype 1, which is the most represented in terms of sequences (Europe, West Africa, Caribbean and South America), is characterized by only one synonymous substitution (A216). This mutation, however, leads to an increase in ASFV codon preference for alanine (GCG to GCA) (<http://www.jcoinc.com/jp/codon/>), which has surely helped to fix the substitution in the lineage for almost 60 years in three continents. Besides the molecular signature, the distance matrix also supports our proposal for new ASFV classification,

which includes the previous genotype subdivision and additional sub-clustering.

ASFV shows a high evolutionary rate relative to that of other DNA viruses [55]. Consequently, the high substitution rate led to very recent TMRCA: the most common ancestor of ASFV strains currently circulating emerged in around three centuries, in 1700. It is commonly agreed that ASFV is native of East Africa as the disease was first described in Kenya in 1921 after a first outbreak in 1903. Then, during decades ASFV showed a great ability to

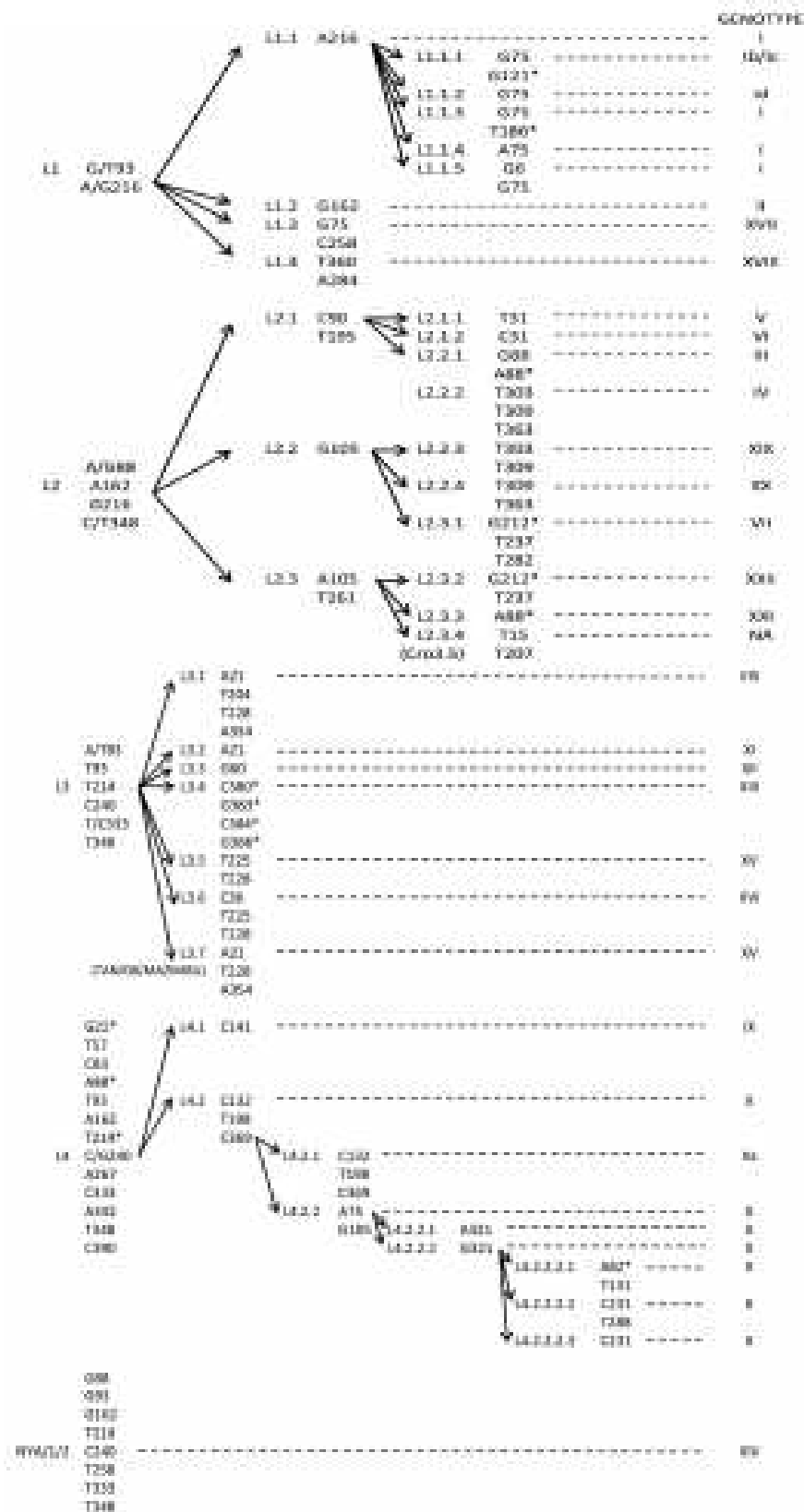


Figure 5. Molecular signatures of ASFV lineages and sub-lineages. Corresponding genotypes are indicated in the right column. Non synonymous substitutions are labeled with ***. NA: not assigned.
doi:10.1371/journal.pone.0069662.g005

spread worldwide following major trade routes. In the wild, the virus is thought to be originally a virus of tick [11] as it infects argasid ticks of the *Ornithodoros* genus. *Ornithodoros*, which infect warthogs' burrows, are endophilic ticks, meaning that they need regular temperature and hygrometry. They also are photophobic so they do not spread out over long distances. ASFV is transmitted horizontally and vertically between ticks [56], [57] and between ticks and juvenile wild swine that stay in and close to their burrows. Under such circumstances, the virus is not supposed to spread much and its genetic drift over long periods may have resulted in isolated spots of diversity maintained by the syzytic cycle with only few entries of new strains. In contrast, the domestic pig cycle is short with a dead-end disease essentially transmitted by contacts with pigs or pig meat and rarely by tick bites. Accordingly, the phylogenetic trees constructed in this study showed higher diversity within lineages of eastern and southern African isolates submitted to a syzytic cycle than in lineages of domestic pigs from other regions. New variants are not easy to characterize because of the lack of sequence data from their parent lineage. For example, TAN/06/Marimba isolate collected in Tanzania in 2006 and originally placed in genotype NV [52] constitutes in this study a sub-lineage of L3. Thus, it should not be considered as a re-emergence of the TAN/01/1 isolate collected during an outbreak in Tanzania in 2001. Sixteen Italian isolates showed recombination events in the E183L gene and were subsequently removed from the corresponding reconstruction. This does not change the affiliation of these isolates to L1, as demonstrated by B646L and CP204L reconstructions (not shown). However, since all these isolates are linked together and show the same recombination events, assuming they all have emerged from a common recombined ancestor, the possibility that they will form a new sub-lineage within L1 has to be considered.

Two different genes and two methods were used to consolidate TMRCAs estimation. Maximum likelihood method using PAML package showed that a strict molecular clock could not be validated for our set of genes. However, it did not provide consistent results when using a relaxed clock, with TMRCAs from ~12000 to 1500. In contrast, the Bayesian approach generated consistent results. B646L and CP204L analyses during a TMRCAs around 1700 AD with a rate of subst/site/year estimated to be

around 6.7×10^{-4} . As illustrated by the E183L gene analysis, the role of the immune system on sequence variability may influence the sequence evolution of some ASFV genes which may consequently render a biased TMRCAs (data not shown for the E183L gene in this paper). Therefore, the natural evolution of the virus may be well represented by B646L and CP204L genes in which neither recombination events nor non-synonymous bias or too many codons under positive selection were detected. The TMRCAs scale going back to 1700 AD for all ASFV isolates can be considered with confidence since within this scale, the TMRCAs of lineage L1-1 and L1-2 were 1943/1955 (for B646L/CP204L genes) and 1990 (for both genes), respectively. L1-1 is supposed to have emerged in the late 1950s [16] and L1-2 includes mainly isolates from Madagascar that were first introduced in 1990 [58]. The substitution rates determined in this study were much higher than expected relative to other large dsDNA viruses like gamma-herpes viruses of vertebrate (10^{-6} subst/site/year) or even small dsDNA viruses like the John Cunningham polyomavirus (10^{-7} subst/site/year) [55]. With a substitution rate between 10^{-4} and 10^{-5} , ASFV approaches RNA viruses that usually have 10^{-2} to 10^{-4} subst/site/year [59].

Like many other large dsDNA viruses [60], ASFV may have co-evolved with its host. This means a long and ancient history of the virus in the wild. A high substitution rate combined with recent TMRCAs is not consistent with ancient co-evolution of viruses and their hosts, which in contrast should lead to a low rate of substitution [61]. However, for a virus that replicates at a high level in its host, a low rate of subst/site/year can still lead to an increased accumulation of diversity, which in turn generates high rates of subst/site/year [62]. This has been described for highly contagious viruses that induce acute forms of infection and show a higher observed rate of subst/site/year [63]. In contrast, an asymptomatic infection of the host may not allow an exponential replication rate. ASFV presents these two characteristics, being asymptomatic in natural African wild swine and soft ticks and highly contagious and lethal in domestic pigs. Consequently, a stochastic event may have occurred around 300 years from now that would explain the emergence of an ancestor common to all known ASFV isolated so far in domestic and wild pigs. Our assumption is based on the introduction of domestic pigs

Table 3. Summary results of all tests done in BEAST for molecular clocking, models, evolution rates, and the TMRCAs obtained.

gene	clock model	population size	evolutionary model	LRT	mean rate subst/site/year (95% HPD)	TMRCAs (95% HPD)
B646L	strict	constant	HKY+ Γ_4	-1898.8	1.321×10^{-4} (7.6×10^{-5} – 1.5×10^{-4})	1623 (1466–1768)
	UCLN	constant	HKY+ Γ_4	-1593.4	6.8×10^{-4} (5.3×10^{-4} – 8.3×10^{-4})	1712 (1465–1894)
CP204L	strict	constant	HKY+ Γ_4	-2453.07	6.26×10^{-4} (1.9×10^{-4} – 1.3×10^{-3})	830 (~204–1010)
	UCLN	constant	HKY+ Γ_4	-2206.03	6.6×10^{-4} (5.7×10^{-4} – 8.75×10^{-4})	1700 (1423–1891)

HPD=higher posterior density.

doi:10.1371/journal.pone.0069662.t003

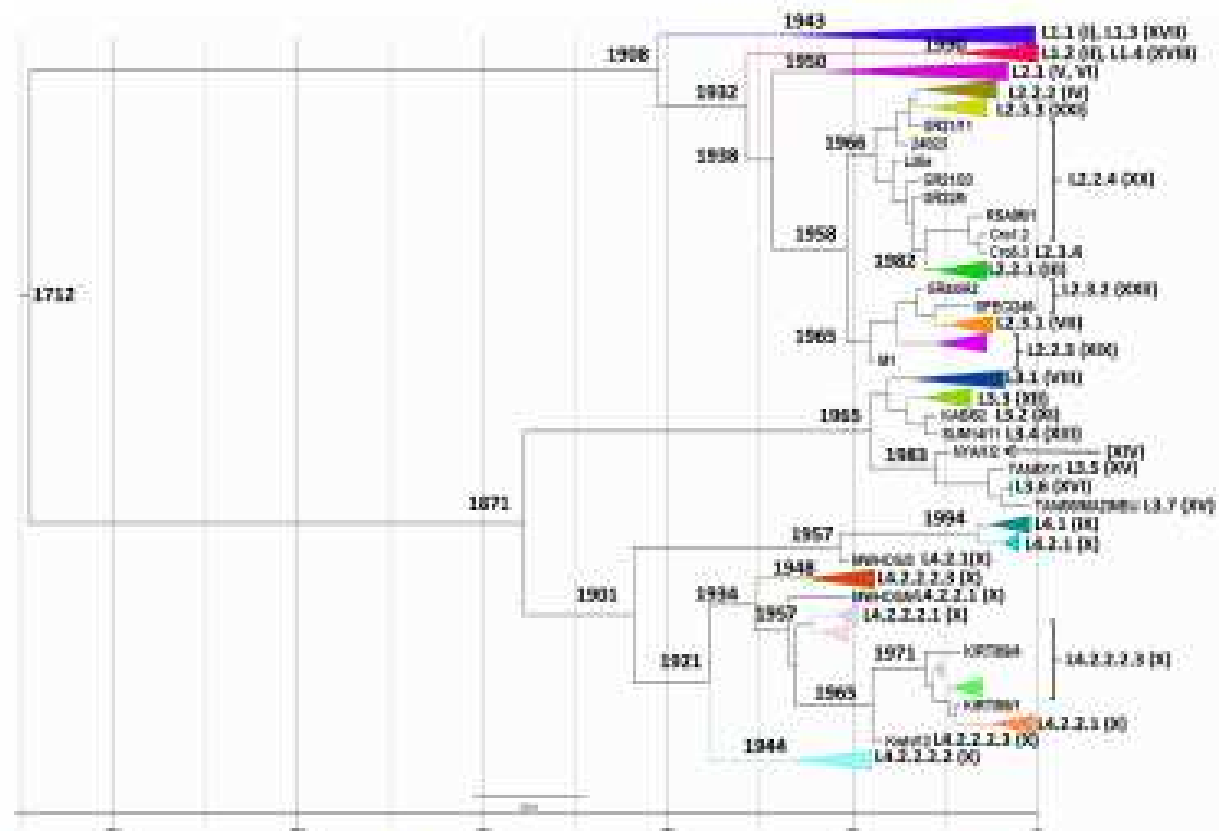


Figure 4. Dated tree representing evolutionary relationships of B646L gene between ASFV isolates. Lineages and corresponding genotypes are indicated. The tree was constructed by BEAST software and the NCMC were run 10^6 times. Time for all isolates TMRCA is 1712. TMRCA of lineage L1-1 (genotype II) and lineage L1-2 (genotype II) are 1943 and 1990, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0069662.g004

in Africa. Domestic pigs have Eurasian and North African ancestral wild boar origins [64]. Even though Png (2001) [65], claimed pigs were introduced in South Africa between the 3rd and 7th centuries, Swan (2010) [66] believes domestic pigs were not present in eastern and southern African livestock because of the nomadic lifestyle of pastoralists at this time. Domestic pigs may have been brought first by the Chinese around 600 years ago [67] then by the Portuguese 300 to 400 years ago [68], both during their exploration and conquest period for trade opportunities. The assumption of pig introduction from Europe and the Far East was confirmed by phylogenetic analysis revealing contributions of both origins in the genetic pattern of local African pigs [69]. Following the circumnavigation of Africa by European nations during 15th - 17th centuries, pig breed types were introduced during 16th and 17th centuries [66], mainly by the Portuguese to the East Africa coast via Goa. Pig breeding diffused then slowly northward from Mozambique [68]. The Portuguese did not colonize Kenya for settlement but as a step to India and definitely left the country in 1720 after being defeated by the Arabs in 1698. Despite Arab colonization and the pig-eating taboo, domestic pigs were eaten by ethnic groups like the Waata in southern Kenya since the 16th century and called Walyankuru; "those who eat pig" [70]. This may have enabled the virus to spread silently among sensitive pig species. Kenya was then colonized by the British. At the end of the 19th century, the extensive pig industry in the native region of ASFV started after a massive loss of bovine cattle due to rinderpest

outbreak. Pigs were massively imported for breeding by colonizers from Seychelles in 1904 and from England in 1905. Pig farming was free ranging at this time and the first outbreak of ASF was reported in 1907. Trade routes and virus resistance in the environment then enabled further spreading of ASFV.

Supporting Information

Table S1. List of ASFV and NCLDV isolates and corresponding genes used in this study.
(DOCX)

File S1. Alignment of NCLDV's capsid proteins.
(FAS)

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge la Direction de la Santé Animale et du Phyosanitaire du Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche of Madagascar for their permission to use Madagascar isolates in this study. François Roger and Roussel Lancelot are warmly thanked for help in Madagascar and Gaël Thibault for scientific advice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VM EA. Performed the experiments: VM. Analyzed the data: VM EA. Contributed reagents/materials/analysis tools: TR. Wrote the paper: VM EA.

References

1. Fournie MJ, Venter W (2009) Review of African swine fever transmission, spread and control. *J S Afr Vet Assoc* 80: 58–62.
2. Contard N, Wieland B, de Lencastre W, Jori F, Ruvinsky R, et al. (2009) African swine fever infection: global spread, its prevention? *Pathol Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 2639–2650.
3. Montgomery R (1991) On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya colony). *J Comp Pathol* 34: 139, 191, 245–262.
4. Fournie MJ, Thomson GR, Ruvinsky R (2009) African swine fever. In: Infectious diseases of livestock, vol 2 (eds Corrier JW, Venter EC, editors), 1009–1119. Oxford, UK: Oxford University Press.
5. Ruvinsky R, Mahdavi V, Hens L, Shalings G, Ours C, et al. (2008) African swine fever virus infection, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis* 14: 1629–1634.
6. Gubarev VA, Krasovskiy FI, Krasovskiy AK, Dubchikov SA (2001) Cartographic analysis of African swine fever outbreaks in the territory of the Russian Federation and computer modeling of the basic reproduction ratio. *Proc Vet Med* 95: 167–174.
7. Dixon LK, Eastman JM, Martin G, Rock DL, Saito M, et al. (2005) Antiviral activity in swine, 2004. *Emerg Infect Dis* 11: 1256–1261.
8. Opat A, Tereba R, Tomasz V, Nakagawa N, Shino Y, et al. (2009) Remarkable sequence similarity between the diacylglycerol-inducing kinase gene and the structural proteins African swine fever virus. *Viral J* 6: 178.
9. Iyer LA, Balaji S, Kannan SV, Anand L (2009) Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Research* 113: 156–184.
10. Iyer LM, Anand L, Kannan SV (2001) Common origin of four diverse families of large nucleocytoplasmic DNA viruses. *J Virol* 75: 11729–11734.
11. Thierriat W (1977) Virus transmission of African swine fever virus. In: Seminar on the ecology, clinical swine fever and African swine fever, 575–587. Ent 2004EN, commission of the European Communities.
12. Blasco R, Aguirre M, Alvarado JM, Vazquez E (1999) Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. *Virology* 256: 430–438.
13. Wadley RJ, Tardif AL (2008) Genetic relationships among African swine fever virus DNA isolates by restriction endonuclease analysis. *Proc Vet Med* 5: 50–62.
14. Blasco R, de la Vega J, Alvarado M, Aguirre M, Vazquez E (1999) Genetic variation of African swine fever virus variable regions near the ends of the viral DNA. *Virology* 256: 254–257.
15. Sun H, Jacobs BL, Smith GL, Dixon LK, Paulsen RM (1999) African swine fever virus open gene 12 encodes a 25–27 kDa virus protein with variable numbers of amino acid repeats. *J Gen Virol* 76 (Pt 5): 1127–1132.
16. Rodes AD, Fournie MJ, Contard N, Edwards JR, Shalings G, et al. (2008) Genotyping field studies of African swine fever virus by partial p72 gene characterization. *Arch Virol* 148: 609–616.
17. Lubisi RA, Ruvinsky R, Ours C, Venter W (2005) Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch Virol* 150 (12): 2439–2452.
18. Ruvinsky R, Ruvinsky R, Gubarev VA, Venter W (2007) Genetic characterization of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1979–1999). *Vet Microbiol* 121: 45–55.
19. Dixon LK, Williams TJ (1988) Genetic diversity of African swine fever virus isolates from wild birds (*Ornithobacterium leucogaster*) inhabiting wetland habitats in Zambia. *J Gen Virol* 69 (Pt 12): 2981–2983.
20. Gubarev VA, Mwangi DM, Mahdavi V, Aris M, Tereba R, et al. (2009) Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through multilocus sequencing of the pM, p72, and p80/82 (CN3) genes. *Virus Genes* 38: 35–45.
21. Xu KJ, Gubarev VA, Shalings G, Blasco R, Dixon LK (2009) Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genomic regions. *Arch Virol* 154: 2475–2484.
22. Ntshang J, Zhai L, Lu Z, Burage T, Katik G, et al. (2009) Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins pM, p72, and p78 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology* 319: 337–345.
23. Tamura K, Nei M, Nei M, Nei M, Nei M, Nei M (2001) BEAST: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 18: 2731–2739.
24. Xia N, Xu Z (2001) DAADE software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92: 371–374.
25. Lohman P, Kuo J (2009) DnaSP v1: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1435–1437.
26. Hark L, van der Walt E, Venter EC, Martin GP (2009) Recombination patterns in aphidiviruses: more than found in other picornaviruses. *J Virol* 83: 1127–1132.
27. Martin D, Ryland E (2008) RNA detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 24: 503–505.
28. Felsenstein J, Nei M, Nei M (1999) Possible emergence of new genotypes by frequent recombination. *Virology* 255: 218–225.
29. Nei M (1993) Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 36: 126–139.
30. Martin DP, Fournie MJ, Crandall KA, Williamson C (2005) A modified bootstrap algorithm for automated identification of recombination hotspots and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21: 108–112.
31. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2009) Surrogate: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombination responses. *Bioinformatics* 25: 173–182.
32. Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368–376.
33. Jolly G, van Helden A, Swenson K (2009) TREEFINDER: a parallel graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* 9: 32.
34. Akaike H (1973) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
35. Sugita N (1998) Further analysis of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections. *Communication in Statistics Theory* 27: 11–26.
36. Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6: 461–464.
37. Hasegawa M, Nei M, Terauchi T (1995) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 23: 169–174.
38. Yang Z (1999) Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol* 50: 512–516.
39. Rodriguez J, Oliver JL, Marin A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol* 142: 485–501.
40. Stammer K, Rambaut A (2002) Inferring confidence sets of possibly unsequenced gene trees. *Proc Biol Sci* 269: 137–142.
41. Rambaut A, Pybus OJ (2002) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *Bioinformatics* 18: 754–755.
42. Rambaut A, Pybus OJ (2002) Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 18: 1517–1524.
43. Delange S, Wolf S, Muller TG, Knapp E (2008) Characterization and immunolocalization of major structural proteins in the human dengue virus 1 NS-L. *Virology* 369 (2): 148–155.
44. Guedes A, Gouveia JM, Delgado R, Gouveia D, Faria AL (2007) Genetic sequence of a clinical isolate of the varicella virus: Latin strain comparison to other sequences. *J Gen Virol* 88 (Pt 7): 1959–1968.
45. Schuster P, Hahnemann M, Sarge O, Dues G (1991) The primary structure of the thymidine kinase gene of fetal herpesvirus disease virus. *Virology* 180 (2): 435–449.
46. Yang Z (2003) PAML: a phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol* 20: 1502–1514.
47. Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
48. Zuckerkandl E, Pauling L (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* 257–264.
49. Rambaut A (2008) Tracer [computer program]. <http://www.tracer.imm.ac.uk/tracer/>.
50. Gubarev VA, Gubarev VA, Ogiwara A, Iwano C, Nishi K, et al. (2011) Genetic characterization of African swine fever viruses from recent and historical outbreaks in Nigeria. *Virus Genes* 42 (3): 377–387.
51. Zhai L, Ruvinsky R, Ruvinsky R, Zhai L, Ruvinsky R, et al. (2005) Prevalent diagnosis of African swine fever in recombined virus by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 43 (3): 112–116.
52. Minato G, Maganishi J, Minato J, Yaguchi M, Van Duynhoven J, et al. (2010) Genetic characterization of African swine fever viruses from a 2008 outbreak in Tanzania. *Transboundary Emerging Dis* 58: 40–52.
53. Tsubota CA, Schuster P, Kohn R, Dues G (1990) The major capsid protein of herpesvirus: a suitable target for the study of viral evolution? *Virus Genes* 10: 29–40.
54. Hasegawa M, Nei M, Terauchi T (1995) African swine fever virus protein pM interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) during infection. *PLoS Path* 3 (5): 1275–1286.
55. Duffy S, Shalings G, Hark L (2008) Rates of evolutionary change in virus sequences and determinants. *Nat Rev Genet* 9: 262–270.
56. Hark L, Shalings G, Lohman A, Crandall KA (2009) Clearance of African swine fever virus from infected wild (deer) colonies. *J Med Entomol* 26: 303–312.
57. Fournie MJ, Frey CJ, Gubarev VA (1974) Sexual transmission of African swine fever virus in the field. *Ornithobacter leucogaster* (pigeon). *Rev Vet Sci* 13: 105–111.
58. Gubarev VA, Ruvinsky R, Ruvinsky R, Ruvinsky R, Ruvinsky R, et al. (2008) Isolation of a new heterologous, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar. *Epithelial Infect* 12: 459–469.
59. Hark L, Shalings G, Gubarev VA (2009) A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol Biol Evol* 26: 1074–1080.
60. Holmes EC (2004) The phylogeography of human viruses. *Mol Biol Evol* 21: 715–726.
61. Holmes EC, Drummond AJ (2007) The evolutionary genetics of viral emergence. *Curr Top Microbiol Immunol* 315: 51–66.
62. Hughes AL, Iacono S, Friedman R (2009) The evolutionary biology of proteins. *Islet Genet Evol* 10: 50–56.
63. Firth C, Kitchin A, Shapiro R, Sackland MA, Holmes EC, et al. (2010) Using non-structural data to estimate evolutionary rates of double-stranded RNA viruses. *Mol Biol Evol* 27: 3038–3051.

64. Gallard-Guinaudeau D, Haneault O (2012) Domesticating Animals in Africa: Implications of Genetic and Archaeological Findings. *J World Pigeon* 24: 1–21.
65. Plug I, Ruderhans S (2011) The distribution of mammals in Southern Africa over the past 30,000 years. *Transvaal Museum Monograph* 15, South Africa.
66. Stuart T, Kester A, Olivier PAS, Goudier JF (2012) Mitochondrial-based characterisation of Southern African domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *South African Journal of Animal Science* 40: 120–122.
67. Leventhal LE (1984) *When China Ruled the Seas: The Treasure Fleet of the Dragon Throne, 1405–1433*. New York: Oxford University Press.
68. Hensley RM (1999) A history of pigs in Africa. In Hensley RM, Mac Donald L., editors. *Origins and development of African Swine: An interdisciplinary, genetic, linguistic and ethnographic*. Florence, I.T.A.: Knowledge Books: 335–367.
69. Kariuki O, Opiyo A, Tuma A, Tuma A, Gallaudo D, et al. (2009) Integrating Y-chromosomal, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. *Mol Biol Evol* 26: 2061–2072.
70. Kariuki CM, Kariuki SR (2009) *Historical and other Archaeological investigations of economy and trade in Tana, north-western Kenya*. Department of Anthropology, The Field Museum, Chicago, Illinois, 00000: 24: 14–24.

ANNEXE III

Tableau 14 : Les différents isolats exploités lors de cette étude.

Isolat viral	Date d'isolement	Pays origine	Génotype	B646L	KP117R	CP204L	Référence
				N° accession			
1/Nu/97	1997	Italie	I	FR668398	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
11/Og/04	2004	Italie	I	FR668403	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
16/Og/04	2004	Italie	I	FR682502	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
18/Nu/04	2004	Italie	I	FR677326	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
2/Og/97	1997	Italie	I	FR668399	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
22/Nu/04	2004	Italie	I	FR668405	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
23/Or/04	2004	Italie	I	FR668406	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
24/Or/04	2004	Italie	I	FR668407	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
25/Nu/04	2004	Italie	I	FR668408	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
3/Og/98	1998	Italie	I	FR668400	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
30/Ol/04	2004	Italie	I	FR668410	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
36/Ss/05	2005	Italie	I	FR668411	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
38/Ss/07	2007	Italie	I	FR668412	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
41/Og/07	2007	Italie	I	FR668413	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
42/Og/07	2007	Italie	I	FR668414	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
43/Og/07	2007	Italie	I	FR668415	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
5/Ca/02	2002	Italie	I	FR668402	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
51/Nu/09	2009	Italie	I	FR668419	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
53/Nu/09	2009	Italie	I	FR677327	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
98/ASF/NG	1998	Nigéria	I	AF159503	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Abk07	2007	Géorgie	II	JX857509	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
Ali61	1961	Espagne	I	FJ154445	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Almodovar99	1999	Portugal	I	DQ028306	-	-	Duarte <i>et al.</i> , 2005
Almodovar99E2	1999	Portugal	I	DQ028308	-	-	Duarte <i>et al.</i> , 2005
Almodovar99NE1	1999	Portugal	I	DQ028309	-	-	Duarte <i>et al.</i> , 2005
Ambalanomby09	2009	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
Ambamala10	2010	Madagascar	II	-	p22	p30	Cette étude
Ambaton01	2001	Madagascar	II	KC610529	-	-	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Ambatondrazaka09	2009	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
Ambilo03	2003	Madagascar	II	KC610528	-	KC610540	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Ambositra09	2009	Madagascar	II	p72	p22	p30	Cette étude
Ambovo99	1999	Madagascar	II	KC610527	-	-	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Ampani99	1999	Madagascar	II	KC610526	-	EU620686	Michaud <i>et al.</i> , 2013

Ampasambazimba09	2009	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
ANG/70	1970	Angola	I	AF301542	-	EU874271	Bastos <i>et al.</i> , 2003
ANG/70	1970	Angola	I	-	-	EU874271	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Ang72	1972	Angola	I	FJ174378	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ankavandra08	2008	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
Antana00	2000	Madagascar	II	KC610525	-	-	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Antani03	2003	Madagascar	II	KC610523	-	EU620687	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Antsir99	1999	Madagascar	II	-	-	KC610541	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Antsira02	2002	Madagascar	II	-	-	KC610542	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Antsirabe09	2009	Madagascar	II	-	p22	p30	Cette étude
Arivo01	2001	Madagascar	II	-	-	KC610543	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Arm07	2007	Arménie	II	JX857508	-	-	Gallardo <i>et al.</i> 2012
Arménie07	2007	Arménie	II	-	JQ771687	-	Vlasova <i>et al.</i> , 2012
Atsimondrano10	2010	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
Av71	1971	Espagne	I	FJ174349	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Avara02	2002	Madagascar	II	KC610522	-	KC610544	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Avaradrano10	2010	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
Awoshie99	1999	Ghana	I	AF504885	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Az08B	2008	Azerbaïdjan	II	JX857516	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
Az08D	2008	Azerbaïdjan	II	JX857515	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
B74	1974	Espagne	I	FJ174350	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ba71V	1971	Espagne	I	FJ174348	-	M96354	Bastos <i>et al.</i> , 2003
BAN/91/1	1991	Malawi	VIII	AY351501	-	EU874260	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Barrancos93	1993	Portugal	I	DQ028307	-	-	Duarte <i>et al.</i> , 2005
Bartlett2	1959	Kenya	X	AY351532	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Bel13/Grodno	2013	Biélorussie	II	KJ627215	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
BEL85	1985	Belgique	I	AF449466	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
BEL85	1985	Belgique	I	-	-	JQ764952	van Heerden <i>et al.</i> , 2012
BEN97/4	1997	Bénin	I	AY972164	-	-	Phologane <i>et al.</i> , 2005
Benin97/1	1997	Bénin	I	AF302816	-	AM712239	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Betrok99	1999	Madagascar	II	-	-	KC610556	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Brazil78	1978	Brésil	I	FJ238537	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Brazil79	1979	Brésil	I	AF302809	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
BUR/84/1	1984	Burundi	X	AF449463	-	EU874298	Bastos <i>et al.</i> , 2003
BUR/84/2	1984	Burundi	X	AF449464	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
BUR/90/1	1990	Burundi	X	AF449472	-	EU874299	Bastos <i>et al.</i> , 2003
BUR/90/3	1990	Burundi	X	AY351525	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Ca04.1	2004	Italie	I	FR668270	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
Ca78	1978	Italie	I	FJ174357	-	-	Nix <i>et al.</i> , 2006
Ca97	1997	Italie	I	FJ174371	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009

CAM/02/1	2002	Caméroun	I	-	-	EU874267	Heath <i>et al.</i> , 2008
CAM/02/2	2002	Caméroun	I	-	-	EU874268	Heath <i>et al.</i> , 2008
CAM/02/3	2002	Caméroun	I	-	-	EU874269	Heath <i>et al.</i> , 2008
CAM/02/4	2002	Caméroun	I	-	-	EU874270	Heath <i>et al.</i> , 2008
CAM/82	1982	Caméroun	I	AF301544	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
CAM/85/4	1985	Caméroun	I	-	-	EU874272	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Che07	2007	Russie	II	JX857510	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
CHG/88/1	1988	Zambie	VIII	AY351552	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
CHJ/89/1	1989	Zambie	VIII	AY351519	-	EU874262	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
CHK/89/2	1989	Zambie	VIII	AY351526	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
CHM/88/1	1988	Zambie	VIII	AY351520	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Chrôme01	2001	Madagascar	II	KC610524	-	EU620688	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Co61	1961	Espagne	I	FJ174346	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Co62	1962	Espagne	I	FJ174347	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Co68	1968	Espagne	I	FJ238538	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Coimbra87	1987	Portugal	I	DQ028310	-	-	Duarte <i>et al.</i> , 2005
Cro1.2	1996	Afrique du sud	XX	AY578690	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005
CV97	1997	Cap Vert	I	FJ174380	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
CV98	1998	Cap Vert	I	FJ174381	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
CVR/Tet20	2005	Nigéria	I	GQ427180	-	-	Owolodun <i>et al.</i> , 2010
CVR/Tet21	2005	Nigéria	I	GQ427181	-	-	Owolodun <i>et al.</i> , 2010
CVR/Tet29	2006	Nigéria	I	GQ427183	-	-	Owolodun <i>et al.</i> , 2010
Dagestan09	2009	Russie	II	JX857517	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
Dakar59	1959	Sénégal	I	AF301538	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Davis	1959	Kenya	X	AY351527	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
DED/89/1	1989	Malawi	VIII	AY351502	-	EU874256	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
DED/91/1	1991	Malawi	VIII	AY351503	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Dedza	1986	Malawi	VIII	AF449479	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Doig	1957	Kenya	X	AY351528	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
DomRep79	1978	Rép Dominicaine	I	AF302810	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
DOWA	1986	Malawi	VIII	AY351509	-	EU874261	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
DR2	1979	Rép Dominicaine	I	ASVMCPC	-	-	Yu <i>et al.</i> , 1996
E70	1970	Espagne	I	AY578692	-	AF462272	Zsak <i>et al.</i> , 2005
E75	1975	Espagne	I	AY578693	-	AF462271	Zsak <i>et al.</i> , 2005
Elbrus	2008	Russie	II	-	JQ771688	-	Vlasova <i>et al.</i> , 2012
F6	1996	Afrique du sud	XIX	AY578694	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005
Faharet98	1998	Madagascar	II	-	-	KC610545	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Fandria01	2001	Madagascar	II	-	-	KC610546	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Fianara00	2000	Madagascar	II	KC610521	-	KC610547	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Fianarantsoa09	2009	Madagascar	II	-	p22	p30	Cette étude

Fierenana09	2009	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
Fr64	1964	France	I	FJ174374	-	-	Nix <i>et al.</i> , 2006
GAM/1/00	2000	Gambie	I	-	-	AF449478	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Gara08	2008	Madagascar	II	-	p22	KC610548	Cette étude
Gasson	1961	Kenya	X	AY351529	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Georgia2007	2007	Géorgie	II	AM999764	-	AM999766	Rowland <i>et al.</i> , 2008
Georgia2007	2007	Géorgie	II	-	FR682468	-	Chapman <i>et al.</i> , 2011
GHA/1/00	2000	Ghana	I	AF504888	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Ghana	2000	Ghana	I	AF504889	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
GHANA/02/1	2002	Ghana	I	-	-	EU874293	Heath <i>et al.</i> , 2008
GR21/11	1978	Afrique du sud	XX	FJ455836	-	-	Arnot <i>et al.</i> , 2009
GR21/23	1978	Afrique du sud	XX	FJ455837	-	-	Arnot <i>et al.</i> , 2009
GR22/6	1978	Afrique du sud	XX	FJ455838	-	-	Arnot <i>et al.</i> , 2009
GR44A2	1979	Afrique du sud	XX	FJ455835	-	-	Arnot <i>et al.</i> , 2009
GUL/88/1	1988	Zambie	VIII	AY351521	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Hai81	1981	Haïti	I	FJ174375	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
HindeI	1954	Kenya	X	AY351530	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
HindeII	1959	Kenya	X	AF449480	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
HOL86	1986	Pays Bas	I	AF449467	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
ht79	1979	Haïti	I	AY578695	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005
Hu90	1990	Espagne	I	FJ174355	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Hu94	1994	Espagne	I	FJ174356	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
IC/1/96	1996	Côte d'Ivoire	I	AF302814	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
IC/2/96	1996	Côte d'Ivoire	I	AF302815	-	EU874282	Bastos <i>et al.</i> , 2003
IC/3/96	1996	Côte d'Ivoire	I	AF504882	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
IC/5/76	1996	Côte d'Ivoire	I	AF504883	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
IC96	1996	Côte d'Ivoire	I	FJ174379	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Imeritsiatosika14	2014	Madagascar	II	p72	-	-	Cette étude
Ing08	2008	Russie	II	JX857511	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
JON/89/13	1989	Zambie	VIII	AF449469	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
K1	1996	Afrique du sud	III	AY578696	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005
KAB/62	1983	Zambie	XI	AY351522	-	EU874289	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KAB/94/1	1994	Kenya	X	AY972163	-	-	Phologane <i>et al.</i> , 2005
KAC/91/2	1991	Malawi	VIII	AY351504	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KAL/88/1	1988	Zambie	VIII	AF449468	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Kalmykia09	2009	Russie	II	X857519	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
KANA/89/1	1989	Zambie	VIII	AY351523	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Kat67	1967	RDC	I	FJ174377	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Katanga63	1963	RDC	I	AF301540	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
KAV/89/1	1989	Zambie	VIII	AF449470	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003

Ken/05/1	2005	Kenya	IX	-	-	EU874301	Heath <i>et al.</i> , 2008
Ken05.DPk16	2005	Kenya	X	HM745264	-	HM745369	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPk18	2005	Kenya	X	HM745265	-	HM745370	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPk2	2005	Kenya	X	HM745263	-	HM745368	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPk21	2005	Kenya	X	HM745266	-	HM745371	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPk27	2005	Kenya	X	HM745267	-	HM745372	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPN15	2005	Kenya	X	HM745269	-	HM745374	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPN2	2005	Kenya	X	HM745268	-	HM745373	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPN23	2005	Kenya	X	HM745270	-	HM745375	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPU1	2005	Kenya	X	HM745271	-	HM745376	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPU11	2005	Kenya	X	HM745273	-	HM745378	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPU2	2005	Kenya	X	HM745272	-	HM745377	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.DPU22	2005	Kenya	X	HM745274	-	HM745379	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk1	2005	Kenya	X	HM745253	-	HM745358	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk10	2005	Kenya	X	HM745262	-	HM745367	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk2	2005	Kenya	X	HM745254	-	HM745359	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk3	2005	Kenya	X	HM745255	-	HM745360	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk4	2005	Kenya	X	HM745256	-	HM745361	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk5	2005	Kenya	X	HM745257	-	HM745362	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk6	2005	Kenya	X	HM745258	-	HM745363	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk7	2005	Kenya	X	HM745259	-	HM745364	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk8	2005	Kenya	X	HM745260	-	HM745365	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken05.Tk9	2005	Kenya	X	HM745261	-	HM745366	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken06.B1	2006	Kenya	IX	FJ154434	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken06.B2	2006	Kenya	IX	FJ154435	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken06.B3	2006	Kenya	IX	FJ154436	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken06.B4	2006	Kenya	IX	FJ154437	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken06.B5	2006	Kenya	IX	FJ154438	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken06.Bus	2006	Kenya	IX	FJ154439	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken06.Kis	2006	Kenya	IX	FJ154440	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken07.Eld1	2007	Kenya	IX	FJ154441	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken07.Eld2	2007	Kenya	IX	FJ154442	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken07.Kia	2007	Kenya	IX	FJ154443	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken07.Nak	2007	Kenya	IX	FJ154444	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Ken08Tk.2/1	2008	Kenya	X	HM745275	-	HM745380	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken08Tk.2/3	2008	Kenya	X	HM745276	-	HM745381	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken08WH/4	2008	Kenya	IX	HM745285	-	HM745390	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken08WH/5	2008	Kenya	IX	HM745286	-	HM745392	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken08WH/8	2008	Kenya	IX	HM745287	-	HM745391	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken09Tk.13/1	2009	Kenya	X	HM745277	-	HM745382	Gallardo <i>et al.</i> , 2011

Ken09Tk.13/2	2009	Kenya	X	HM745278	-	HM745383	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken09Tk.15/4	2009	Kenya	X	HM745279	-	HM745384	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken09Tk.15/6	2009	Kenya	X	HM745280	-	HM745385	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken09Tk.19/11	2009	Kenya	X	HM745283	-	HM745388	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken09Tk.19/2	2009	Kenya	X	HM745281	-	HM745386	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken09Tk.19/7	2009	Kenya	X	HM745282	-	HM745387	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Ken09Tk.20/5	2009	Kenya	X	HM745284	-	HM745389	Gallardo <i>et al.</i> , 2011
Kenya1950	1950	Kenya	X	AY261360	-	EU874297	Heath <i>et al.</i> , 2008
ker64	1964	Kenya	I	AY578697	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005
Killeani	1959	Kenya	X	AY351550	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KilleaniII	1959	Kenya	X	AY351551	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KilleaniIII	1959	Kenya	X	AY351531	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KimakiaI	1961	Kenya	I	AY351533	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KimakiaI	1961	Kenya	I	-	-	JQ764954	van Heerden <i>et al.</i> , 2012
KimakiaII	1961	Kenya	I	AY351534	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KIRT/89/2	1989	Tanzanie	I	AY351511	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KIRT/89/3	1989	Tanzanie	X	AY351512	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KIRT/89/4	1989	Tanzanie	X	AY351513	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KIRW/89/1	1989	Tanzanie	X	AY351514	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
KLI/88/2	1988	Zambie	VIII	AY351553	-	EU874258	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
kn66	1966	Kenya	X	AY578698	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005
Krasnodar	2008	Russie	II	-	JQ771689	-	Vlasova <i>et al.</i> , 2012
Krasnodar12	2012	Russie	II	-	-	KJ195684	Vlasova <i>et al.</i> , 2014
Kwh/12	1968	Tanzanie	X	AF301546	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
LIL/89/1	1989	Malawi	VIII	AY351505	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
LIL/90/1	1990	Malawi	VIII	AY351510	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Lillie	1973	Afrique du sud	XX	DQ250109	-	EU874306	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
Lis57	1957	Portugal	I	AF301537	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Lis60	1960	Portugal	I	AF301539	-	EU874273	Bastos <i>et al.</i> , 2003
LIV/10/11	1983	Zambie	I	AY351535	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
LIV/12/17	1983	Zambie	I	AY351524	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
LIV/13/33	1983	Zambie	I	AY494560	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
LIV/5/4	1983	Zambie	I	AY351537	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
LIV/9/31	1983	Zambie	I	AY351538	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
LIV/9/35	1983	Zambie	I	AY351539	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
LIV5/40	1982	Zambie	I	AY351536	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
LT14/1482	2014	Lithuanie	II	KJ627217	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
LT14/1490	2014	Lithuanie	II	KJ627216	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
LUS/93/1	1991	Zambie	I	AY351563	-	EU874275	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
M1	1966	Afrique du sud	XIX	AY578699	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005

M61	1961	Espagne	I	FJ174345	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
MAD/1/1998	1998	Madagascar	II	AF270706	-	KC867503	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Madrid/62	1962	Espagne	I	AF449461	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Mafra86	1986	Portugal	I	DQ028312	-	-	Duarte <i>et al.</i> , 2005
Mahaja02	2002	Madagascar	II	-	-	KC610549	Michaud <i>et al.</i> , 2013
MAL/1978	1978	Malawi	VIII	AF270707	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
MAL/2002/1	2002	Malawi	V	AY494553	-	EU874311	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Malte78	1978	Malte	I	AF301543	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
MAN/89/2	1989	Zambie	VIII	AY351562	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Marovo02	2002	Madagascar	II	-	-	KC610550	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Masindray10	2010	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
MAU/2007/1	2007	Maurice	I	FJ528594	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2009
MAU/2008/1	2008	Maurice	I	FJ528595	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2009
Mauritius2008/1	2008	Maurice	II	-	-	JQ764915	van Heerden <i>et al.</i> , 2012
Mauritius2008/6	2008	Maurice	II	-	-	JQ764920	van Heerden <i>et al.</i> , 2012
MCH/89/1	1989	Malawi	VIII	AY351506	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MCH/89/3	1989	Malawi	VIII	AY351507	-	EU874259	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Mchinji075	1997	Malawi	VIII	AY351508	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MFUE/6/1	1982	Zambie	XII	AY351561	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MHC/89/1	1989	Malawi	VIII	-	-	EU874292	Heath <i>et al.</i> , 2008
Mkuzi78	1978	Afrique du sud	I	AY578700	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005
MKUZI79	1979	Afrique du sud	I	AY261362	-	EU874294	Heath <i>et al.</i> , 2008
Morama98	1998	Madagascar	II	-	-	KC610551	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Moronda02	2002	Madagascar	II	KC610520	-	KC610552	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Morondava09	2009	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
MOZ/02/1	2002	Mozambique	II	-	-	EU874315	Heath <i>et al.</i> , 2008
MOZ/02/2	2002	Mozambique	II	-	-	EU874274	Heath <i>et al.</i> , 2008
MOZ/03/1	2003	Mozambique	II	-	-	EU874314	Heath <i>et al.</i> , 2008
MOZ/05/1	2005	Mozambique	V/VI	-	-	EU874313	Heath <i>et al.</i> , 2008
Moz/1/03	2003	Mozambique	II	FJ175199	-	-	Heath <i>et al.</i> , 2008
Moz/1/05	2005	Mozambique	II	FJ175200	-	-	Heath <i>et al.</i> , 2008
MOZ/1/98	1998	Mozambique	VIII	AF270705	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
MOZ/1960	1960	Mozambique	V	AF270708	-	EU874309	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/1979	1979	Mozambique	V	AF270709	-	EU874310	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/2001/1	2001	Mozambique	VIII	AY351516	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MOZ/2002/1	2002	Mozambique	II	AY351517	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MOZ/2002/2	2002	Mozambique	II	AY351518	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MOZ/60/98	1998	Mozambique	II	AY274455	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/61/98	1998	Mozambique	II	AY274456	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/62/98	1998	Mozambique	VIII	AY274457	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004

MOZ/63/98	1998	Mozambique	II	AY274458	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/70/98	1998	Mozambique	II	AY274459	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/77/98	1998	Mozambique	II	AY538726	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/94/1	1994	Mozambique	VI	AF270711	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
MOZ/94/1	1994	Mozambique	V/VI	-	-	EU874263	Heath <i>et al.</i> , 2008
MOZ/94/8	1994	Mozambique	V/VI	-	-	EU874276	Bastos <i>et al.</i> , 2003
MOZ/94/8	1994	Mozambique	VI	AF270712	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/94/8	1994	Mozambique	V/VI	-	-	EU874276	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Moz/98/1	1998	Mozambique	VIII	-	-	EU874317	Heath <i>et al.</i> , 2008
MOZ/A/98	1998	Mozambique	VIII	AY274452	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/B/98	1998	Mozambique	VIII	AY274453	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
MOZ/C/98	1998	Mozambique	VIII	AY274454	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2004
Moz64	1964	Mozambique	V	FJ174376	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
MPI/89/1	1989	Zambie	VIII	AY351540	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MPO89/1	1989	Zambie	VIII	AY351541	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Mu82	1982	Espagne	I	FJ174352	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
MUR/07/1	2007	NC	II	-	-	EU874316	Heath <i>et al.</i> , 2008
MWHOG/1	1959	Kenya	X	AY351548	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MWHOG/3	1959	Kenya	X	AY351549	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MWHOG/9	1959	Kenya	X	AY351565	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
MwLIL20/1	1983	Malawi	VIII	L00966	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
MZI/92/1	1992	Malawi	XII	AY351543	-	EU874288	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
NAM/1/80	1980	Namibie	I	AF504881	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
NAM/1/95	1995	Namibie	XVIII	DQ250122	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
Namahora09	2009	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
NDA/1/90	1990	Malawi	VIII	AF449473	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
NGE/92/1	1992	Malawi	VIII	AY351544	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
NH/P68	1968	Portugal	I	DQ028313	-	-	Duarte <i>et al.</i> , 2005
NIG/01/1	2001	Nigéria	I	-	-	EU874277	Heath <i>et al.</i> , 2008
NIG/1/99	1999	Nigéria	I	AF504887	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
NIG/2/98	1998	Nigéria	I	AY972161	-	-	Phologane <i>et al.</i> , 2005
NIG/3/98	1998	Nigéria	I	AY972162	-	-	Phologane <i>et al.</i> , 2005
NIG/6	1998	Nigéria	I	AF270714	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Nig01	2001	Nigéria	I	FJ174382	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
NKZ88/1	1988	Zambie	VIII	AY351554	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
NO08/Ap	2008	Russie	II	JX857514	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
NO08/Av	2008	Russie	II	JX857513	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
Nu04.3	2004	Italie	I	FR668262	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
Nu04.4	2004	Italie	I	FR668263	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
Nu04.6a	2004	Italie	I	FR668264	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011

Nu04.6b	2004	Italie	I	FR668265	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
Nu04WB	2004	Italie	I	FR668269	-	-	Giammarioli <i>et al.</i> , 2011
Nu81	1981	Italie	I	FJ174358	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Nu90.1	1990	Italie	I	AF302813	-	-	Nix <i>et al.</i> , 2006
Nu91.3	1991	Italie	I	FJ174364	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Nu91.5	1991	Italie	I	FJ174365	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Nu93	1993	Italie	I	FJ174366	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Nu95.1	1995	Italie	I	FJ174368	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Nu96	1996	Italie	I	FJ174369	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Nu97	1997	Italie	I	FJ174370	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Nu98.3	1998	Italie	I	FJ174372	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
Nu98.8B	1998	Italie	I	FJ174373	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
NUR/90/1	1990	Italie	I	AF302813	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
NYA/1/2	1986	Zambie	XIV	AY351555	-	EU874302	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
ol	1996	Afrique du sud	XIX	AY578701	-	-	Zsak <i>et al.</i> , 2005
Oren08	2008	Russie	II	JX857512	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
Oren09	2009	Russie	II	-	JQ771690	-	Vlasova <i>et al.</i> , 2012
Ori84	1984	Italie	I	FJ174360	-	-	Nix <i>et al.</i> , 2006
Ori85	1985	Italie	I	FJ174361	-	-	Nix <i>et al.</i> , 2006
Ori90	1990	Italie	I	FJ174363	-	-	Nix <i>et al.</i> , 2006
Ori93	1993	Italie	I	FJ174367	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2009
OURT88/1	1988	Portugal	I	AF302811	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
OURT88/1	1988	Portugal	I	-	-	JQ764949	van Heerden <i>et al.</i> , 2012
OURT88/3	1988	Portugal	I	AM712240	-	AM712240	Nix <i>et al.</i> , 2006
PHW/88/1	1988	Zambie	VIII	AY351567	-	EU874257	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Pol14/Krus	2014	Pologne	II	KJ627219	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
Pol14/Sz	2014	Pologne	II	KJ627218	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
Pr4	1996	Afrique du sud	XX	AY578702	-	AY261363	Heath <i>et al.</i> , 2008
Rostov08	2008	Russie	II	-	JQ771691	-	Vlasova <i>et al.</i> , 2012
Rostov09	2009	Russie	II	JX857518	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
RSA/03/1	2003	Afrique du sud	XX	-	-	EU874278	Heath <i>et al.</i> , 2008
RSA/03/2	2003	Afrique du sud	III	-	-	EU874279	Heath <i>et al.</i> , 2008
RSA/03/3	2003	Afrique du sud	III	-	-	EU874280	Heath <i>et al.</i> , 2008
RSA/04/1	2004	Afrique du sud	III	-	-	EU874284	Heath <i>et al.</i> , 2008
RSA/04/3	2004	Afrique du sud	IV	-	-	EU874308	Heath <i>et al.</i> , 2008
RSA/1/98	1998	Afrique du sud	VII	AF302818	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
RSA/1/99W	1999	Afrique du sud	IV	AF449477	-	EU874307	Bastos <i>et al.</i> , 2003
RSA/95/1	1995	Afrique du sud	XX	DQ250123	-	EU874266	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
RSA/95/4	1995	Afrique du sud	XX	-	-	EU874295	Heath <i>et al.</i> , 2008
RSA/95/5	1995	Afrique du sud	III	DQ250124	-	EU874286	Boshoff <i>et al.</i> , 2007

RSA/96/1	1996	Afrique du sud	XXI	DQ250125	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
RSA/96/2	1996	Afrique du sud	XIX	DQ250126	-	EU874281	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
RSA/96/3	1996	Afrique du sud	XIX	DQ250127	-	EU874283	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
RSA/98/1	1998	Afrique du sud	VII	-	-	EU874312	Heath <i>et al.</i> , 2008
SAL/92/1	1992	Malawi	VIII	AY351546	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
SIY/91/2	1991	Malawi	VIII	AY351566	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
SPEC/120	1987	Afrique du sud	XIX	AF302812	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2000
SPEC/125	1987	Afrique du sud	XIX	DQ250112	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/140	1987	Afrique du sud	III	FJ455840	-	-	Arnot <i>et al.</i> , 2009
SPEC/154	1987	Botswana	VII	DQ250113	-	EU874291	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/207	1989	Namibie	I	DQ250115	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/209	1989	Namibie	I	DQ250116	-	EU874290	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/245	1992	Afrique du sud	XXII	DQ250117	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/251	1992	Afrique du sud	XIX	DQ250118	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/257	1993	Afrique du sud	III	DQ250120	-	EU874265	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/260	1993	Afrique du sud	VII	DQ250121	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/265	1994	Mozambique	VI	AF270710	-	EU874264	Bastos <i>et al.</i> , 2003
SPEC/53	1983	Afrique du sud	XXI	DQ250111	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007
SPEC/57	1985	Afrique du sud	III	FJ455839	-	-	Arnot <i>et al.</i> , 2009
Stavropol	2008	Russie	II	-	JQ771692	-	Vlasova <i>et al.</i> , 2012
StPet09	2009	Russie	II	JX857520	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014
SUM/14/11	1983	Zambie	XIII	AY351542	-	EU874287	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Talatavolonondry10	2010	Madagascar	II	p72	-	p30	Cette étude
TAN/01/1	2001	Tanzanie	XV	AY494552	-	EU874303	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
TAN/03/1	2003	Tanzanie	XVI	AY494550	-	EU874304	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
TAN/03/2	2003	Tanzanie	XVI	AY494551	-	EU874255	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
TAN/08/MAZIMBU	2008	Tanzanie	XV	GQ410765	-	-	Mazinso <i>et al.</i> , 2011
TEN/89/1	1989	Zambie	VIII	AY351556	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Tengani60	1960	Malawi	V	AF301541	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Tengani62	1962	Malawi	V/VI	-	-	EU874296	Heath <i>et al.</i> , 2008
THY/90/1	1990	Malawi	VIII	AY351545	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
TMB/89/1	1989	Zambie	VIII	AY351557	-	EU874285	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Togo/98	1998	Togo	I	AF449481	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Tolagna01	2001	Madagascar	II	KC610519	-	KC610553	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Tolagna99	1999	Madagascar	II	KC610518	-	EU620689	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Toliar98	1998	Madagascar	II	-	-	KC610554	Michaud <i>et al.</i> , 2013
Trench	1959	Kenya	X	AY351547	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
Tsididy08	2008	Madagascar	II	p72	p22	KC610555	Cette étude
Tsididy09	2009	Madagascar	II	-	p22	-	Cette étude
Tver0312/Novo	2012	Russie	II	KJ627212	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2014

Tver0312/Torjo	2012	Russie	II	KJ627211	-	-	Gallardo et al., 2014
Tver0511/Torjo	2011	Russie	II	KJ627208	-	-	Gallardo et al., 2014
Tver0712/Les	2012	Russie	II	KJ627210	-	-	Gallardo et al., 2014
Tver0812/Bolo	2012	Russie	II	KJ627209	-	-	Gallardo et al., 2014
Tver1112/Zavi	2012	Russie	II	KJ627214	-	-	Gallardo et al., 2014
Ug03H.1	2003	Ouganda	IX	FJ154428	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2004
Ug03H.2	2003	Ouganda	IX	FJ154429	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2004
UG07.F7	2007	Ouganda	IX	GQ477143	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2004
UG07.F8	2007	Ouganda	IX	GQ477144	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2004
UG07.Mukono	2007	Ouganda	IX	GQ477142	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2004
UG07.Wak1	2007	Ouganda	IX	GQ477138	-	-	Gallardo <i>et al.</i> , 2004
UGA/95/1	1995	Ouganda	IX	-	-	EU874300	Heath <i>et al.</i> , 2008
UGA/95/3	1995	Ouganda	X	AF449476	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
Uganda	1965	Ouganda	X	L27499	-	-	Bastos <i>et al.</i> , 2003
UgH03	2003	Ouganda	IX	EF121429	-	-	Blanco <i>et al.</i> , 2006
Ukr12/Zapo	2012	Ukraine	II	JX857521	-	-	Gallardo et al., 2014
Warmbaths	1987	Afrique du sud	III	AY261365	-	-	Kutish <i>et al.</i> , 2003
Warthog	1980	Namibie	IV	AY261366	-	-	Kutish <i>et al.</i> , 2003
ZAM/88/1	1988	Zambie	VIII	AY351559	-	-	Lubisi <i>et al.</i> , 2005
ZIM/92/1	1992	Zimbabwe	XVII	DQ250119	-	-	Boshoff <i>et al.</i> , 2007

SUMMARY

Name: RANDRIAMPARANY Tantely

Title: African Swine Fever diagnosis adapted to tropical conditions by the use of dried-blood filter papers and molecular characterization of Malagasy strains.

African swine fever (ASF) is a highly contagious virus infection of wild and domestic pigs. It is caused by a DNA virus, *Asfivirus*, currently the sole arbovirus member of the *Asfarviridae* family, but can also be acquired through the ingestion of contaminated feedstuffs and transmitted by certain tick species. It was first described in Kenya in 1921 and since then many countries worldwide were infected and produced a serious socioeconomic impact.

No vaccines or drugs are available to prevent or treat ASF infection. Therefore, it is particularly important that ASF-free areas be maintained free by preventing the introduction of the disease. All control and eradication measures applicable are based on classical disease control methods, including intensive surveillance, epidemiological investigation, tracing and stamping out of infected herds. These measures are combined with strict quarantine and biosecurity measures and animal movement control. These informations illustrated the importance of the fast diagnosis for control and eradication plan.

During this study, blood, sera, and corresponding dried blood filter paper samples from experimentally infected pigs from three European Laboratories (CISA and CReSA, Spain and ANSES, France) and from farms and abattoirs in Madagascar and pig farm samples from Côte d'Ivoire were collected and analyzed. Conventional and real-time PCR, viral isolation and antibody detection by ELISA were performed on paired samples (blood/tissue versus dried-blood 3MM filter papers) were used directly in the conventional and real-time PCR without previous extraction of nucleic acids.

It was possible to use Whatman 3MM filter papers collected as early as 1–3 days after infection in direct conventional or real-time PCRs for early detection of ASFV genome. All tests on 3MM filter papers had 100% specificity but sensitivity had more variable (65.2 – 95.7%) compared to the gold standards. In addition, blood-dried filter papers were tested in ELISA for antibody detection and the observed sensitivity was very close to conventional detection on serum samples and gave comparable results respectively of 32.6% [95% CI, 23.2 - 42] et 34.8% [95% CI, 25.3 - 44.3].

In this study, ASFV continued to be detected for at least 9 months at ambient temperature (22–25°C), and it is likely that even higher temperatures will not interfere with the preservation of the material; then serological and virological test gave respectively 0.17% and 17.8% [95% CI, 10.26 - 25.66], sero- and viro-prevalence.

ASF is still endemic to Madagascar since its introduction in 1997. Molecular characterization of isolates has demonstrated which may offer useful epidemiological information of the disease. Isolate genotyping was assessed by comparing concatenated amino acid sequences of proteins encoded B646L, KP177R and CP204L sequences using a maximum likelihood algorithm. The studied Malagasy previous viruses displayed 100% p72 gene sequence identity into one cluster of genotype II that suggested their origin from one isolate until now.

In summary, Whatman 3-MM filter papers are a cheap, simple and rapid support for blood collection, preservation and ASF disease diagnosis either by ELISA, direct conventional and real-time PCRs, and virus isolation. Other advantages of 3MM filter paper strips include the small volume of blood that is required and the ability to collect a large number of samples (Dubay et al., 2006). In this study, Whatman 3-MM filter papers proved to be a suitable support for the collection, storage and use of blood in remote areas of tropical countries without the need for a cold chain.

Key word: ASF, 3MM, PCR, QPCR, Viral Isolation, Serology, Phylogeny

Supervisor: Pr RAHERIMANDIMBY Marson

Trainers: Emmanuel ALBINA, Vincent MICHAUD

Laboratories: National Laboratory of veterinary Diagnosis, LNDV Antananarivo, (Madagascar); Virology Laboratory of UMR15 CIRAD Montpellier (France); ANSES Ploufragan, (France); Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA Madrid (Espagne), Centre de Recerca en Sanitat Animal, CReSa Barcelone (Espagne)

RESUME

Nom : RANDRIAMPARANY Tantely

Titre : Validation d'un diagnostic de la peste porcine africaine (PPA) utilisant des papiers buvards et caractérisation moléculaire des souches malgaches

Au cours de cette étude, la performance du papier buvard Whatman 3MM pour collecter, stocker du sang séché à température ambiante, de détecter le virus et l'anticorps de la PPA a été effectuée. Des échantillons des études expérimentales fournis par les laboratoires de recherche en Europe, de prélèvement des abattoirs et des élevages de Madagascar et de Côte d'Ivoire ont été utilisés pour évaluer l'aptitude de ce papier buvard sur les techniques PCR conventionnelles et à temps réel (Taqman et UPL), l'isolement viral et la détection des anticorps par ELISA.

Le papier filtre 3MM a été utilisé directement sans extraction d'acide nucléique pour la détection du virus en utilisant les techniques conçues pour les prélèvements standards (sang, organe, sérum).

Utilisant le papier buvard 3MM, il est possible de détecter la maladie très précocement de 1 à 3 jours après l'infection. Les résultats sérologiques et virologiques ont montré des spécificités de 100% pour toutes les analyses. Par contre, les sensibilités sont plus variables (65,2 – 95,7%) selon les techniques utilisées lors des comparaisons entre papier buvard Whatman 3MM et les échantillons standards. En plus, une comparaison de la détection des anticorps entre papier buvard 3MM / sérum donne une séroprévalence semblable respectivement de 32,6% [IC₉₅ : 23,2% à 42%] et 34,8% [IC₉₅ : 25,3% à 44,3%].

A Madagascar, la détermination de la circulation du virus PPA montre une séroprévalence très faible de 0,17%. Par contre la prévalence virologique est de 17,8% [IC₉₅ : 10,26% à 25,66%].

La caractérisation moléculaire des souches fait comprendre l'épidémiologie de la maladie. A Madagascar, cette maladie a été ignorée avant et a été vraisemblablement introduite mi - 1997 dans la région de Taolagnaro par une souche mozambicaine. Les analyses phylogénétiques des souches malgaches ont portées sur les gènes B646L, KP177R et CP204L utilisant la méthode du maximum de vraisemblance. Les résultats de cette caractérisation moléculaire ont montré l'existence des souches malgaches appartenant dans un même cluster du génotype II. Les comparaisons des gènes B646L avec les souches anciennes de Madagascar montrent une ressemblance à 100% suggérant qu'elles proviennent d'un même isolat.

Le papier buvard Whatman 3MM présente plusieurs avantages. Il est un support peu coûteux, simple et rapide pour la collecte de sang, la préservation à température ambiante et le diagnostic de la maladie de la PPA en utilisant l'ELISA, les PCR directes conventionnelles et à temps réel, et l'isolement du virus. D'autres avantages du papier filtre 3MM comprennent le plus petit volume de sang requis et la capacité de recueillir un grand nombre d'échantillons (Dubay et al, 2006).

Mots clés : PPA, 3MM, PCR, QPCR, Isolement viral, Sérologie, Phylogénie,

Directeur de Thèse : Pr RAHERIMANDIMBY Marson

Encadreur : Emmanuel ALBINA, Vincent MICHAUD

Laboratoires : *Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire, LNDV Antananarivo, (Madagascar) ; Laboratoire de Virologie UMR15 CIRAD Montpellier (France) ; Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, ANSES Ploufragan, (France,) Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA Madrid (Espagne), Centre de Recerca en Sanitat Animal, CRESA Barcelone (Espagne)*
